

Année 1965 - N° 519

TITRE DE LA THÈSE

**ÉTUDE ÉLECTROPHORÉTIQUE ET
IMMUNOÉLECTROPHORÉTIQUE DES PROTÉINES
SOLUBLES DE L'AORTE HUMAINE NORMALE
ET ATHÉROSCLÉREUSE.**

(Travail du laboratoire de Chimie Biologique et Médicale
de la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de Lyon).

THÈSE

Pour le Doctorat de l'Université de Lyon

Section Pharmacie

présentée et soutenue publiquement devant la Faculté mixte
de Médecine et de Pharmacie de Lyon.

le 23 Juin 1965

par

NGUON HOA

Ex-interne en Pharmacie des Hôpitaux de Lyon.

Assistant au laboratoire de Chimie Biologique et Médicale de la Faculté mixte de Médecine
et de Pharmacie de Lyon.

Certificat d'Etudes spéciales de Parasitologie.

Certificat d'Etudes spéciales d'Hématologie.

né le 11 Juillet 1934

à TAN HOI

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
DE LYON

Année 1965 - N° 519

TITRE DE LA THÈSE

ÉTUDE ÉLECTROPHORÉTIQUE ET
IMMUNOÉLECTROPHORÉTIQUE DES PROTÉINES
SOLUBLES DE L'AORTE HUMAINE NORMALE
ET ATHÉROSCLÉREUSE.

(Travail du laboratoire de Chimie Biologique et Médicale
de la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de Lyon).

THÈSE

Pour le Doctorat de l'Université de Lyon

Section Pharmacie

présentée et soutenue publiquement devant la Faculté mixte
de Médecine et de Pharmacie de Lyon.

le 23 Juin 1965

par

NGUON HOA

Ex-interne en Pharmacie des Hôpitaux de Lyon.

Assistant au laboratoire de Chimie Biologique et Médicale de la Faculté mixte de Médecine
et de Pharmacie de Lyon.

Certificat d'Etudes spéciales de Parasitologie.

Certificat d'Etudes spéciales d'Hématologie.

né le 11 Juillet 1934

à TAN HOI



FACULTE MIXTE DE MEDECINE
ET DE PHARMACIE DE LYON

PERSONNEL de la FACULTE

Doyens Honoraires :

M. J. LEPINE - Membre de l'Institut
M. H. HERMANN - Correspondant de l'Institut

Doyen : M. J. F. CIER

Assesseurs : MM. M. LEVRAT
L. REVOL

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. COLLET, GUIART, PATEL, LEPINE, TRILLAT, MOURIQUAND, MAZEL, GARIN, GATE,
MARTIN, GABRIELLE, DUCLOS, GUILLEMINET, HERMANN, ROCHET, POLLOSSON.

PROFESSEURS

MM. CIBERT	Clinique Urologique
PONTHUS (détaché à Beyrouth)	Physique biologique
DECHAUME	Clinique neuro-psychiatrique et d'Hygiène mentale
CHAMBON	Chimie organique et toxicologie
WERTHEIMER	Clinique chirurgicale P
PAUPERT-RAVAULT	Clinique médicale B
FROMENT	Clinique et prophylaxie cardio-vasculaires
CROIZAT	Clinique médicale C
ENSELME	Chimie biologique et médicale
MALLET-GUY	Clinique chirurgicale A
REVOL	Pharmacie galénique
PIGEAUD	Clinique Obstétricale
BOURRET	Médecine du travail
LEVRA T	Clinique médicale A
SOHIER	Hygiène et action sanitaire et sociale
NETIEN	Botanique et cryptogamie
BERTRAND	Clinique chirurgicale C
BADINAND	Chimie analytique pharmaceutique
DREVON	Pharmacie chimique et pharmacologie
ROCHE	Médecine légale et déontologie
COUDERT	Parasitologie et pathologie exotique
MOUNIER-KUHN	Clinique d'Oto-rhino-laryngologie et d'audio-phonologie
PAUFIQUE	Clinique ophtalmologique
THIERS	Clinique de dermatologie, syphiligraphie et allergologie
BRUN	Clinique de pneumo-phtisiologie
CREYSSEL	Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique

DARGENT
 GUICHARD
 GIRARD Paul
 LATARJET
 PEYCELON
 GIRARD Marcel
 VACHON
 GALY
 PAPILLON
 JEUNE
 GONIN
 MONNET
 BANSSILLON
 CHATONNET
 GUINET
 TRILLAT
 FREIDEL
 MARION Joseph
 DORCHE
 DUMONT Louis
 PERROT
 CIER J.F.
 PERRIN J.
 MICHAUD Pierre
 SARROUY Charles
 MATHIEU
 FAUCON
 X....
 X....

Clinique carcinologique
 Anatomie pathologique
 Pathologie générale et expérimentale
 Anatomie
 Pathologie chirurgicale
 Clinique médicale D
 Pathologie médicale
 Physio-pathologie des voies respiratoires
 Radiologie
 Clinique médicale Infantile et Hygiène du 1er âge
 Thérapeutique
 Bactériologie
 Physiologie et pathologie obstétricales
 Physiologie B
 Clinique endocrinologique
 Clinique de chirurgie orthopédique
 Clinique stomatologique
 Clinique de chirurgie et d'orthopédie infantiles
 Matière médicale et législation pharmaceutique
 Histologie et embryologie
 Chimie
 Physiologie A
 Thérapeutique chirurgicale et chirurgie opératoire
 Clinique de chirurgie cardiaque
 Clinique médicale infantile
 Clinique gynécologique
 Biologie médicale et pharmacodynamie
 Clinique des maladies infectieuses
 Hydrologie thérapeutique, climatologie et écologie sociale

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

M. BERGER
 BERTOYE
 MANSUY
 COLLET
 LACROIX
 LIARAS
 LECUIRE
 REVOL
 GOINARD
 CIER André
 PONT Maurice
 TRAEGER

Physique nucléaire appliquée à la médecine
 Bactériologie
 Neuro-chirurgie
 Chimie générale et pharmaceutique
 Hygiène et climatologie
 Clinique chirurgicale propédeutique
 Neuro-chirurgie
 Médecine générale
 Thérapeutique chirurgicale
 Pharmacie Chimique et Pharmacologie
 Médecine générale
 Médecine générale

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. ROMAN
 FEROLDI
 MORET
 ODDOUX
 De SOLLIERS

Parasitologie
 Anatomie pathologique
 Physique biologique
 Botanique et cryptogamie
 Chimie analytique

MM. DESPIERRES
GARIN
TOLOT

Médecine générale
Parasitologie
Médecine du travail

MAITRES DE CONFERENCES -AGREGES TITULAIRES

MM. CREYSSSEL Roger
THIVOLET
PINET
GUYOTAT
DESCOTES
JOUVET
PEYRIN
TOMMASI
BUFFARD
LEJEUNE
De MOURGUES F.
NAUSSAC
REBOUILLAT
ROMAGNY
DELAHAYE
DELEUZE
GIRAUD
MICHEL
FRANCOIS
MICHOUPLIER
COLOMB
LAMBERT
FRIES
GILLY
ROBERT
BOUCHET
BETHENOD
GERMAIN
KALB
LARBRE
SOUSTELLE
VIALA
VINCENT
COLIN

Chimie biologique
Hygiène
Electro-radiologie
Neuro-psychiatrie
Chirurgie générale
Pathologie expérimentale
Physique biologique
Anatomie pathologique
Electro-radiologie
Médecine générale et thérapeutique
Stomatologie
Maladies infectieuses
Chirurgie générale
Pédiatrie
Médecine générale
Anesthésiologie
Electro-radiologie diagnostic et thérapeutique
Anesthésiologie
Pédiatrie et puériculture
Chirurgie générale
Dermatologie
Médecine générale
Médecine générale
Pédiatrie
Médecine générale
Anatomie
Pédiatrie
Immunologie, sérologie, hématologie
Pneumo-phtisiologie
Pédiatrie
Chirurgie Générale
Médecine Générale
Bactériologie, parasitologie, virologie
Médecine légale

MAITRES DE CONFERENCES -AGREGES STAGIAIRES

MM. FAVRE -GILLY
GIROD
GRAS
MALLEIN
RIFFAT
FLANDROIS
VIALIER-RAYNARD
ROLLET

Hématologie
Histologie et embryologie
Chimie biologique
Chimie analytique
Hygiène
Physiologie
Bactériologie
Pharmacie galénique

AGREGES EN EXERCICE

MM. BONAMOUR

De MOURGUES Georges

DEVIC

DUMONT Martial

DURAND

FRANCILLON

SAUBIER

SCHOTT

ALLEGRE

CHASSARD

FAYSSÉ

GAILLARD

GARDE

HUGONNIER

Ophtalmologie

Chirurgie générale

Médecine générale

Obstétrique

Urologie

Chirurgie générale

Chirurgie générale

Neuro-psychiatrie

Neuro-chirurgie

Electro-radiologie

Orthopédie

Oto-rhino-laryngologie

Médecine générale

Ophtalmologie

MARET

MORNEX

MOUNIER-KUHN Alain

NORMAND

PERRIN André

DUMAS

GARMIER

NOEL

SCHNEPP

Chirurgie générale

Médecine générale

Chirurgie générale

Médecine générale

Médecine générale

Stomatologie

Obstétrique

Médecine générale

Orthopédie

Examineurs de la Thèse

Président : M. le Professeur J. ENSELME

Assesseurs: MM. le Professeur A. CIER

le Professeur Agrégé J. O. PEYRIN

le Professeur Agrégé J. GRAS

A LA MEMOIRE DE MON PERE

Puisse le souvenir de son courage
et de sa force d'âme me rendre
digne de son exemple.

Je ressens profondément son absence
en ce jour.

A MA MERE, à qui je dois plus que je ne saurais dire.

Avec toute ma profonde reconnaissance
et ma plus tendre affection.

A MA FEMME

En témoignage de mon amour, je lui
offre ce travail, aboutissement des
études pour lesquelles elle m'a tou-
jours encouragé.

A MON FILS SOMERA

Source de ma joie

A MES BEAUX-PARENTS

Leurs sacrifices et leurs affections
sont sans bornes, je leur exprime
ici toute ma sincère reconnaissance.

A MES FRERES ET SOEURS

Pour les liens qui nous unissent.

A Monsieur TRAN CHIEU

Témoignage de profond respect.

A TOUS CEUX QUI ME SONT CHERS.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE
Monsieur le Professeur J.ENSELME

Il nous fait aujourd'hui un grand honneur
en acceptant de présider notre jury.

Nous tenons à le remercier et à l'assurer
de notre très profond respect.

A NOS JUGES

Monsieur le Professeur A. CIER

La clarté de son enseignement a toujours été pour nous source renouvelée de satisfaction.

Nous le prions de bien vouloir trouver ici l'expression de notre admiration et de la reconnaissance que nous lui témoignons d'avoir accepté d'être notre juge.

Monsieur le Professeur Agrégé J. O. PEYRIN

Avec son affabilité coutumière, il nous a toujours réservé le meilleur des accueils.

Q'il trouve ici le témoignage de notre profonde gratitude.

Monsieur le Professeur Agrégé J. GRAS

Depuis trois ans, nous collaborons avec lui au sein d'une équipe qu'il dirige avec dynamisme et enthousiasme.

C'est lui qui nous a confié ce travail, il a été notre guide. Nous lui devons notre goût de la recherche et notre culture dans le domaine de l'immunochimie.

Il nous fait profiter de ses connaissances ; sa constante bienveillance a beaucoup facilité notre tâche.

Qu'il nous soit permis de lui exprimer aujourd'hui notre reconnaissance et notre sincère attachement.

AUX PROFESSEURS DE LA FACULTE MIXTE DE
MEDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON.

AUX PHARMACIENS CHEFS DES HOPITAUX DE LYON

AUX MEDECINS DES HOPITAUX DE LYON

A MES CAMARADES D'INTERNAT

Nous gardons un souvenir reconnaissant des
belles années d'études et d'internat passées auprès
d'eux.

En présentant ce travail, nous tenons à
remercier tous ceux qui nous ont aidé
à sa réalisation ;

Monsieur le Docteur J. FREY

Monsieur le Docteur J. C. HENRY

Chefs de travaux

Qui ont bien voulu nous faire bénéficier de
leur expérience et nous donner de multiples con-
seils.

Madame Y. GUDEFIN

Technicienne

Qui avec sa gentillesse habituelle nous a
apporté une aide précieuse.

I N T R O D U C T I O N

Le travail que nous présentons concerne l'étude des protéines solubles du Tissue aortique et plus particulièrement de la paroi aortique humaine saine et athéroscléreuse.

Les Lipides, qui sont toujours présents sur l'aorte athéroscléreuse ont été étudiés en premier lieu par les biochimistes ; les résultats des travaux expérimentaux ont permis de se faire une idée suffisamment nette du phénomène . A l'état normal, deux hypothèses ont été émises. Ou bien les molécules de lipoprotéines plasmatiques traversent la paroi artérielle en passant de l'intima vers l'adventice : c'est un phénomène de filtration, ou bien il peut s'agir d'une formation "in situ" de ces molécules. Mais si ces molécules sont trop volumineuses ou si elles se trouvent dans un état physico-chimique particulier , elles peuvent être arrêtées au niveau de la couche sous endothéliale et s'y déposer .

Les dépôts lipidiques dans les couches sous épithéliales apparaissent donc comme le fait élémentaire.

Par contre, les chylomicrons sont des particules trop grosses pour subir le processus de filtration.

Mais en étudiant la constitution de la lésion athéroscléreuse, les histologistes et les anatomopathologistes ont montré que les protéines et les glycoprotéines jouent certainement un rôle essentiel.

Sur le plan évolutif, la plaque athéroscléreuse se présente sous plusieurs aspects (66) :

- La plaque fibreuse : elle présente un aspect homogène.
- La plaque athéromateuse vraie : elle présente une substance pâteuse blanchâtre lipo-calcaire. Cette plaque peut s'ulcérer, aboutissant au " bourbillon " athéromateux.
- La plaque calcaire : Elle se forme en dernier lieu: ce stade est caractérisé par la présence d'un aspect dense, homogène et il provoque un pavage en coquille d'oeuf.

On peut supposer qu'il existe filiation entre les trois formes précédentes mais aucune certitude ne peut être retenue. Seules la première et la deuxième peuvent être utilisées pour l'étude des protéines solubles dans la partie intime de l'aorte. La troisième constitue un stade évolutif tellement poussé qu'une étude rationnelle devient impossible.

Avant de passer à l'étude proprement dite des techniques et des résultats de notre expérimentation il est nécessaire de faire brièvement un rappel des données histologiques principales concernant l'organe que nous avons étudié et en particulier de celles qui concerne l'intima.

L'intima est formée d'une couche unique de cellules endothéliales reposant presque directement sur la limitante élastique interne ou sur la couche la plus superficielle des lames élastiques de la média.

Dans cette intima idéale, le tissu conjonctif est très réduit, il se limite à quelques amas de mucopolysaccharides au contact de la limitante élastique et à des cellules conjonctives en très petit nombre.

C'est la prolifération de ce matériel histologique du tissu conjonctif de l'intima qui crée la lésion initiale de l'athérosclérose. En effet, toute atteinte d'origine physico-chimique, toxique, mécanique, physiopathologique ou infectieuse à l'intégrité de la paroi aortique favorisera les dépôts des protéines et des lipo-calcaires et ainsi le développement des lésions athéromateuses.

Pour MOON (59-60-61), le développement des lésions d'athérosclérose est le processus de réparation des tissus de connection à la suite d'une agression.

Afin d'essayer d'apporter notre contribution aux recherches entreprises en vue d'élucider l'origine et le mécanisme intime de la formation de la plaque athéroscléreuse nous nous sommes attachés à poursuivre des travaux déjà réalisés dans le Laboratoire.

Notre plan est le suivant :

CHAPITRE PREMIER

ETUDE DES TECHNIQUES UTILISEES

- I°) TECHNIQUE D'EXTRACTION
- II°) ELECTROPHORESE SUR PAPIER
- III°) ELECTROPHORESE LIBRE OU "MOVING BOUNDARY METHOD"
- IV°) IMMUNO-ELECTROPHORESE

CHAPITRE DEUXIEME

ETUDE DES RESULTATS OBTENUS

- I°) OBSERVATIONS ANATOMIQUES DES AORTES
- II°) APPRECIATIONS MACROSCOPIQUES DU DEGRE DES LESIONS
- III°) RESULTATS ANALYTIQUES

CHAPITRE TROISIEME

CONCLUSIONS GENERALES

CHAPITRE PREMIER

ETUDE DES TECHNIQUES UTILISEES

I°) TECHNIQUE D'EXTRACTION

II°) ELECTROPHORESE SUR PAPIER

- 1 - Historique
- 2 - Etude de la théorie de l' électrophorèse
- 3 - Technique proprement dite

III°) ELECTROPHORESE LIBRE OU "MOVING BOUNDARY METHOD"

IV°) IMMUNO-ELECTROPHORESE

- 1 - Généralités
- 2 - Etude de la théorie de l'immuno-électrophorèse
- 3 - Technique proprement dite

CHAPITRE PREMIER

ETUDE DES TECHNIQUES UTILISEES

Parmi les études récentes sur les méthodes générales d'extraction utilisées dans le cas des protéines du tissu aortique, nous retiendrons seulement celles basées sur l'emploi des solvants minéraux qui semblent d'utilisation plus générale.

Nous essayerons ensuite d'exposer les différentes méthodes d'études de ces protéines extraites : par électrophorèse sur papier d'une part et par immuno-électrophorèse d'autre part.

I - TECHNIQUE D' EXTRACTION

Les protéines aortiques sont facilement extractibles par des solvants neutres ou par des solutions isotoniques.

VALDIGUIE , DOUSTE - BLAZY et LAVABRE (88 - 89) les ont extraites avec une solution de glucose à 0,25 M .

FREY (22) a essayé une extraction dans l'acide chlorhydrique 3 N , mais il ne peut obtenir que peu de protéine et l'analyse électrophorétique n'a donné aucun résultat reproductible.

Avec la soude 3 N le même auteur a pu extraire des quantités plus importantes de protéines solubles mais l'étude électrophorétique ne permet de séparer seulement que deux fractions . L'auteur ne pouvait guère extraire que 5 ou 8 mg de protéines solubles par gramme de tissu frais. KAYAHAN (39) puis FREY (22) et CHATAGNON (9) ont utilisé une solution isotonique de chlorure de Sodium à 9‰. Ils ont noté des différences de mobilité électrophorétique sur ces protéines extraites, mais ils n'ont pas pu les identifier.

Dans sa thèse, FREY (22) a observé que le dosage des protéines totales extraites par le chlorure de Sodium montre que l'extrait peut contenir $34 (\pm 9,3)$ mg de protéines par gramme de tissu frais pour les fragments normaux et $32 (\pm 8,7)$ mg de protéines par gramme de tissu frais pour les fragments athéroscléreux.

A la lumière de ces derniers travaux , nous avons pensé souhaitable de reprendre la méthode d'extraction par la solution isotonique de chlorure de Sodium à 9‰.

La crosse aortique et une partie de l'Aorte descendante allant jusqu'à la bifurcation abdominale sont prélevées à l'autopsie et immédiatement lavées pendant 10 minutes à l'eau courante.

La dissection de toutes les aortes analysées a été réalisée le jour même du prélèvement.

L'examen macroscopique sur l'aorte ouverte longitudinalement permet d'estimer le degré et l'étendue des lésions d'athérosclérose. Nous avons adopté les appellations des degrés recommandées par l' O.M.S. (63).

Degré	0	= Aorte apparemment normale.
	1	= Présence de stries , ou tache de graisse sur l'intima.
	2	= Présence de plaques fibreuses et plaques athéromateuses , mais sans ulcération ou complication.
	3	= Lésions compliquées d'ulcération, d'hémorragie, de thromboses.

Avant l'extraction des protéines solubles , nous avons enlevé soigneusement le tissu graisseux ; pour cela l'adventice de l'aorte est arrachée selon un plan de clivage qui sépare les couches les plus externes de la média. L'aorte débarrassée de graisse est ensuite lavée abondamment dans plusieurs bains d'eau courante afin d'éliminer le sang et les protéines sériques. Cette opération permet également un dégraissage grossier de l'adventice.

Une dissection permet de ne conserver que la partie intima et un peu de la juxta intima , mais en général une très mince lame de média reste adhérente.

Il faut signaler qu'il est excessivement difficile de séparer l'intima de la média dans les degrés 2 et 3 de l'athérosclérose, surtout dans le cas 3; une grande partie de la média reste alors accolée à l'intima.

Afin de permettre une étude statistique valable, nous avons prélevé sur chaque aorte les différentes parties de l'intima.

Les fragments aortiques ainsi obtenus sont ensuite rincés à plusieurs reprises avec la solution isotonique de chlorure de Sodium à 9%, ce qui permet d'enlever les dernières traces de protéines sériques. Nous avons utilisé, pour vérifier cela, la réaction du Biuret selon la technique de

GORNALL (20) et nous avons constaté que vers le sixième lavage, la solution obtenue donne une réaction du Biuret franchement négative. En outre la réaction immunologique d' OUCHTERLONY (38-64-65) sur plaque est également négative.

Les fragments aortiques sont ensuite coupés en petits morceaux et broyés à 45.000 tours par minute dans un homogénéiseur (*) en présence de 1 ml de chlorure de Sodium à 9% par gramme de tissu frais et ce pendant trois minutes à la vitesse de 10.000 t/mn. Afin d'éviter l'échauffement dû au broyage, le flacon d'homogénéisation est refroidi par immersion dans un récipient contenant de la glace pilée.

Après une extraction de 24 heures à + 4° , le broyat est soumis à une centrifugation à grande vitesse (18.000 t/mn) pendant 20 minutes dans une centrifugeuse réfrigérée (+4°).

Le surnageant est ensuite décanté :

- . Sur une partie du surnageant , nous avons procédé à un dégraissage à l'éther refroidi à - 25° comme le préconisait FREY (22).
- . Parallèlement, nous avons travaillé sur le surnageant sans passage par l'éther.

Pour chaque extrait des protéines aortiques, nous avons dosé les protides totaux par la méthode du Biuret selon la technique de GORNALL (20).

(*) - Homogénéiseur BIOREX H 45I Equipements Industriels
1, rue Monticelli - Paris (14^e)

II - ELECTROPHORESE SUR PAPIER

Le phénomène de la migration des particules , sous l'effet d'un champ électrique est connu depuis fort longtemps ; LODGE (47) a essayé de démontrer en 1886 que les particules dispersées d'un précipité ou d'une solution colloïdale étaient sensibles à l'influence d'un champ électrique. Plus tard, vers l'année 1906 LINDER et PICTON (48) ont commencé l'étude systématique de ce phénomène.

Les travaux de TISELIUS (82) en 1937 ont redonné vie à la vieille cataphorèse. Il apporta ainsi à l'analyste un incomparable instrument de travail inconnu jusqu'alors : l' ELECTROPHORESE .

MICHAELIS (56) désigne par électrophorèse " la migration des micelles colloïdales dans un champ électrique".

Il existe deux sortes d'électrophorèses différentielles :

- A - L'électrophorèse libre = L'électrophorèse dite de Tiselius
- B - L'électrophorèse de zone = nous envisagerons ici seule l'électrophorèse sur papier.

1) HISTORIQUE

Il est curieux de constater que la première électrophorèse pratiquée fut une électrophorèse de zone, alors que par la suite la technique la plus utilisée a surtout été l'électrophorèse de frontières.

En effet en 1909, FIELD et TEAGUE (19) isolèrent la toxine et l'anatoxine diphtériques sur un gel d'agar-agar par une séparation "électrophorétique" (sans que ce mot ne soit d'ailleurs prononcé). Mais l'idée d'un

tel moyen de fractionnement semble avoir été abandonnée entre les années 1925 à 1937 au profit de l'électrophorèse libre.

Depuis, pour simplifier la technique, on cherchait à employer un milieu solide comme support du mélange étudié: papier, poudre de verre, poudre de cellulose, amidon, gelose, gel de silice, fécule de pomme de terre, etc...

KÖNIG (41) et VON KLOBUSITSKY (90) ont préconisé les premiers l'emploi du papier filtre comme support.

DURRUM (16-17) , à la suite des travaux effectués par CONSDEN et Coll. (10) , BUTTLER et STEPHEN (7), HAUGAARD et KRONER (35) FRANKLIN , QUASTEL (21), GROSS et LEBLOND (33) sur les acides aminés et par COOLIDGE et THOMAS (11) sur les protéines sériques, a essayé le premier la réalisation d'une combinaison de la chromatographie sur papier et de l'action d'un champ électrique.

Ainsi est née en 1950 une nouvelle méthode simple et élégante pour la séparation des protéines sériques, facilement réalisable dans tous les laboratoires : L'électrophorèse sur papier.

Dès 1950, les études théoriques de WUNDERLY(93-94-95) sur les courants de convection et les effets de paroi, les travaux originaux de DURRUM (17), CREMER et TISELIUS (13)(83) contribuèrent à parfaire la mise au point de cette nouvelle technique électrophorétique. Celle-ci a connu ainsi une vogue grandissante depuis son introduction en Allemagne par GRASSMANN et HANNIG (32) et en France par MACHEBOEUF et REBEYROTTE (51-52-53-54).

Nous allons étudier successivement :

- La théorie de l'électrophorèse
- La technique proprement dite.

2) ETUDE DE LA THEORIE DE L'ELECTROPHORESE

PRINCIPE

Les principes généraux de cette technique restent dans l'ensemble , les mêmes que ceux de l'électrophorèse en phase liquide : les ions, sous l'action d'un champ électrique, se déplacent dans les canaux capillaires d'une bande inerte comme dans un solvant et obéissent aux mêmes lois.

Sous l'effet d'un champ électrique, la migration des molécules protéiques est rendue possible par le caractère amphotère des protéines.

Or une Protéine est une grosse molécule, composée de nombreux acides aminés, elle possède comme ces derniers à la fois des radicaux acides (- COOH) et basiques (- NH₂) dont l'ionisation confère une charge à la molécule dont ils dépendent.

Le degré de dissociation des fonctions acide et basique de la molécule protéique $R \begin{matrix} \nearrow \text{NH}_2 \\ \searrow \text{COOH} \end{matrix}$ varie avec le pH.

La protéine prend alors sa forme ionisée agissant comme un acide en milieu basique et comme une base en milieu acide.

A un pH bien précis, dit "point isoélectrique" ou pHi , il y a autant de groupements (-COOH) que de groupements (-NH₂) ionisés, la charge totale est nulle et la molécule est immobile dans le champ électrique. Le pH isoélectrique des protéines plasmatiques est voisin de pH = 5.

En milieu alcalin, seuls les radicaux (-COOH) sont dissociés en COO⁻ et H⁺ ; la molécule protéique est alors chargée négativement et se déplacera vers le pôle positif. D'où l'importance du pH et l'intérêt de sa fixité pendant l'expérience.

Plus on s'élève au-dessus du pH isoélectrique de la protéine, plus la fonction acide est ionisée, conférant à la molécule une charge de plus en plus négative ; elle se déplacera vers le pôle positif.

Ainsi, après le passage du courant, durant un certain intervalle de temps, les protéines se séparent en différents constituants caractérisés par leur mobilité électrophorétique.

La méthode aura même cet avantage qu'il sera facile de matérialiser le déplacement et d'identifier la position de l'ion à un instant donné, grâce à un réactif révélateur approprié. Si les différentes catégories de particules ont des mobilités différentes, il sera aisé d'identifier chacune d'elle par des taches différentes.

L'électrophorèse sur papier possède, par rapport à l'électrophorèse de frontières, dite de Tiselius, les différences suivantes (40)(77):

- a) La migration des molécules protéiques d'un champ électrique dans un tube en "U" rempli de solution tampon est remplacée par une migration dans une bande de papier filtre mouillé d'une solution de tampon entre deux électrodes.
- b) Une séparation partielle a lieu dans le tube en "U", donc seules les fractions de composants ayant la migration la plus rapide ou la plus lente peuvent être obtenues pures. L'électrophorèse sur papier rend possible une séparation totale des composants. Elle exige des quantités de sérum très faibles (0,01 à 0,02 ml) et a ainsi le caractère d'une microméthode.
- c) L'enregistrement optique continu de l'évolution de l'électrophorèse libre est, dans l'électrophorèse sur papier, remplacé par un enregistrement du résultat final.

- d) Les différentes fractions d'une électrophorèse sur papier sont révélées au moyen de la coloration de la bande. Cette coloration est basée sur des principes histo-chimiques. La quantité de colorant fixée est dans une certaine relation avec la quantité de la substance examinée.

En photométrant les différentes parties de la bande de papier, on peut calculer la quantité relative des différents composants.

APPAREILLAGE

Il existe deux types d'appareils

- a) Dispositif sans évaporation du solvant
- b) Dispositif avec évaporation continue du solvant.

a) Dispositifs sans évaporation du solvant :

Ils sont dus à CREMER et TISELIUS (13), KUNKEL et TISELIUS (42) BISERTE et HAVEZ (5), SCHNEIDER et WUNDERLY (76): Pour supprimer l'évaporation, les différents auteurs ont proposé de travailler

- soit sous liquides isolants non miscibles à l'eau, tels que l'heptane, le tétrachlorure de carbone, le chlorobenzène ,
- soit entre deux plaques de verre comme le préconisent KUNKEL et TISELIUS.

Mais cet appareillage nécessite un dispositif expérimental particulier et fort coûteux. Il est actuellement plus ou moins abandonné.

b) Dispositifs avec évaporation continue du solvant :

On sait que lorsqu'une bande de papier filtre est placée simplement dans une enceinte close, il n'est absolument pas possible de supprimer

totalelement l'évaporation. On peut diminuer ce phénomène en travaillant avec une faible tension et un abaissement de la force ionique du tampon.

MACHEBOEUF , REBEYROTTE, DUBERT et BRUNERIE (51-54) ainsi que SVENSSON (77)(78) ont montré que l'évaporation qui se produit au niveau de la feuille de papier joue un rôle capital dans le déplacement des protéines : En effet, lorsqu'un ion protéique est arrivé au point limite qui lui correspond, il ne dépasse pas ce point, car il serait alors refoulé par un courant liquidien de sens opposé à son déplacement électrophorétique et de vitesse supérieure à sa propre vitesse électrophorétique. D'autre part, si par suite de la diffusion ou pour toute autre cause, des ions identiques se trouvent retardés dans leur mobilité respective, ce retard sera bientôt comblé, puisque les molécules les plus lentes ont à vaincre un courant liquidien moins rapide. Ceci explique la netteté remarquable des spots.

Les travaux de DURRUM (16) MACHEBOEUF et REBEYROTTE (53) , GRASSMANN et HANNIG (31), pour ne citer que les principaux, ont contribué à la réalisation des dispositifs pratiques permettant ainsi d'obtenir dans de bonnes conditions la séparation d'un mélange protéique.

Suivant les appareils des différents auteurs la bande de papier peut être maintenue en son milieu par un support (figure 1) ou placée horizontalement (figure 2).

L'avantage des appareils du type 1 est de permettre le dépôt à sec de la goutte de mélange à analyser, mais son inconvénient majeur réside dans le fait qu'il ne permet pas un cheminement aussi long que dans les appareils de type 2, dans le cas où les constituants migrent dans le même sens.

Figure 1

Appareil type 1 ou type
MACHEBOEUF - REBEYROTTE

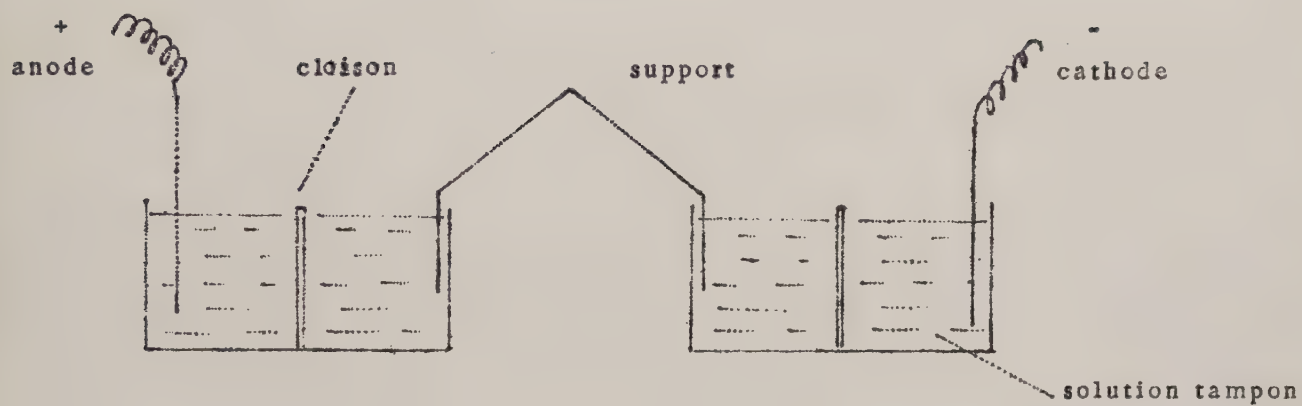
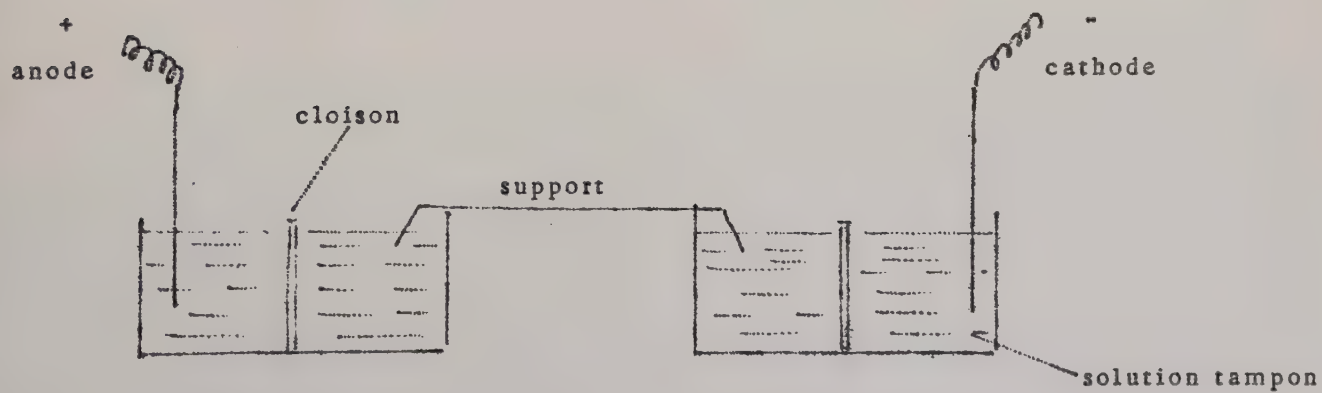


Figure 2

Appareil type 2 ou type
GRASSMANN



L'avantage des appareils du type 1 est de permettre le dépôt à sec de la goutte de mélange à analyser, mais son inconvénient majeur réside dans le fait qu'il ne permet pas un cheminement aussi long que dans les appareils de type 2, dans le cas où les constituants migrent dans le même sens.

Donc, il semble rationnel de réserver l'emploi du type 2 à la séparation des ions métalliques et l'étude des protéines sériques ; et celui du type 1 pour les molécules qui se déplacent dans les deux sens, comme les mélanges d'acides-aminés.

Nous avons utilisé pour nos études sur les protéines aortiques l'appareil de type 2 ou type GRASSMANN. Nous en décrirons le mode d'utilisation par la suite.

PAPIER

Le papier, support inerte, représente la phase stationnaire de l'électrophorèse sur papier, et joue un rôle important dans la séparation électrophorétique. Il est donc nécessaire qu'un choix judicieux de la qualité du papier soit effectué.

En général, le degré d'absorption sur le papier est faible, quand la cellulose est purifiée avec soin par le fabricant.

Le papier le plus couramment utilisé est le WHATMANN N° 1. Il est constitué par 98 à 99% d'alpha cellulose, 0,3 à 1% de beta cellulose et par 0,4 à 0,8% de pentosannes (93). Sa teneur en substance minérale est de 0,07% et s'abaisse à 0,01% pour des qualités à double lavage acide.

D'autres papiers peuvent également être utilisés et nous citerons parmi eux les papiers : WHATMANN N°41 et 43 rapides, N°40 moyen et N° 120 lent.

En dehors des qualités WHATMANN il existe d'autres papiers électrophorétiques tels les papiers MUNKTELL N°20/150 ; MUNKTELL N°20/350 (très épais), SCHLEICHER et SCHÜLL N° 2043.

Les qualités de WHATMANN N°1, de "SCHLEICHER et SCHÜLL N° 2043 a et b Mgl" conviennent particulièrement quand on veut rendre les papiers translucides après coloration.

Pour donner aux papiers de nouvelles propriétés sélectives de séparations, de nombreuses méthodes sont proposées : HOFFPAUIER et GUTHRIE (37) les ont traités par l'acide aminoéthylsulfurique.

LAUTSCH et Coll. (44) décrivent un procédé permettant de munir le papier de groupements carboxyliques.

MICHEEL et SCHWEPPE (57) emploient, pour l'acétylation du papier, un mélange de benzène, d'anhydride acétique et d'acide sulfurique.

Il faut signaler toutefois que le papier, support solide (38), ralentit le déplacement des ions, c'est-à-dire la vitesse de migration dans le champ électrique. N'étant pas électriquement neutre, le papier exerce une action électrostatique (70), celle-ci se manifeste surtout par le phénomène d'absorption des ions sur le papier.

MERCKLEN et MASSAYEFF (58) ont étudié particulièrement ce phénomène : généralement l'absorption se montre plus grande pour l'albumine que pour les globulines. La fraction d'albumine de tête, qui se déplace rapidement, imprègne le papier tout au long de son trajet de migration électrophorétique, si bien que c'est sur un véritable "tapis" d'albumine que vont devoir migrer les autres fractions.

Des observations identiques ont été faites par ARDRY et DELAVILLE (2)

Par conséquent, il y a toujours erreur par excès dans l'estimation des globulines, qui viennent en réalité en surcharge, sur la trainée laissée par le déplacement de l'albumine.

TAMPONS

Le rôle du tampon est capital puisqu'il intervient par son pH, par sa force ionique et par la nature de ses constituants.

a - Le pH du tampon détermine la nature des charges électriques des protéines en solutions, d'après le principe même de l'électrophorèse.

b - La force ionique ou $\frac{I}{2}$ est une caractéristique propre aux solutions tampons. Sa signification est donnée par la formule suivante

$$\frac{I}{2} = \frac{1}{2} \sum C_1 Z_1^2$$

d'où C_1 = la concentration de chaque ion
 Z_1 = sa valence.

On sait qu'une baisse de force ionique entraîne une augmentation de la mobilité des protéines et du courant d'électroendosmose.

c - Les constituants sont variables et extrêmement nombreux. Leur choix est déterminé par les problèmes que l'on cherche à résoudre et par la nécessité d'obtenir des solutions ayant une faible force ionique compatible avec le maintien et la stabilité du pH.

En dehors du classique tampon veronal :

Veronal (acide 5,5 diéthylbarbiturique)	1,85 g
Veronal sodique	10,3 g
Eau distillée q . s . p .	1000 ml

donnant un pH 8,6 et une force ionique 0,05 , nous utilisons un tampon veronal sodique, dont le pH est identique mais la force ionique légèrement plus élevée

$$\mu = 0,1$$

Veronal sodique	24,26 g
H C l N/1	5 ml
Eau distillée q.s.p.	2000 ml
Merseptyl	0,1 g

- DURRUM a montré que le tampon borate :

Acide borique	4,65 g
Borate de Sodium	8,8 g
Eau distillée q.s.p.	1000 ml

de même pH et de même conductivité que le tampon veronal était capable de donner une bonne séparation des fractions $\text{B}\beta_1$, $\text{B}\beta_2$ mais que les $\text{A}\alpha_1$ globulines se déplacent avec l'albumine.

- Un autre tampon très utilisé actuellement est le suivant :

Acide borique	4,6 g
TRIS (Tri hydroxy methyl amino méthane)	60,5 g
E . D . T . A .	6 g
Eau distillée q . s . p .	1000 ml

Ce tampon permet de fractionner le sérum en préalbumine ; albumine ; 3 fractions d' alpha ; 3 fractions de bêta et de gamma (3-12-68) globulines.

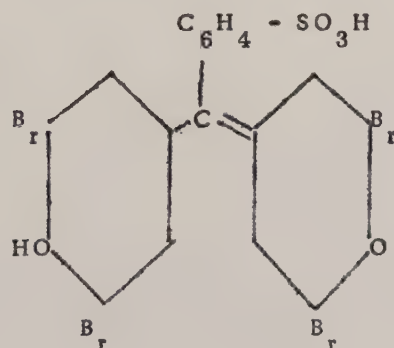
COLORANTS

- Les colorants sont des dérivés synthétiques (44) à noyaux benzéniques, qui possèdent un ou plusieurs groupements chromophores, des groupements auxochromes, et d'autres groupements dissociables -COOH et SO_3H .

- Les colorants utilisés en électrophorèse contiennent presque tous des groupements sulfoniques et sont de ce fait des colorants acides plus ou moins prononcés.

Parmi les plus utilisés, citons :

a) BLEU de BROMOPHENOL (tetra bromophenol sulfonephtaléine)

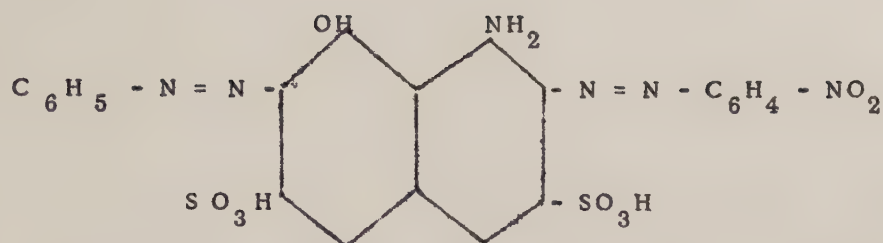


Ce colorant a été préconisé dès 1950 par DURRUM.

CREMER et TISELIUS (13) l'utilisent en solution à 1%, mais il n'est pas dénué d'inconvénients: En effet, ce colorant se fixe inégalement sur l'albumine et les globulines.

b) AMIDO SCHWARTZ 10 B ou NOIR de NAPHTALEINE 12 B 200

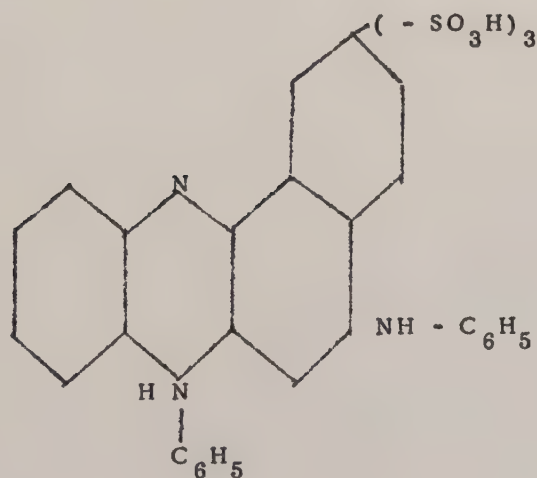
On l'utilise en solution dans le méthanol acétique (91) :



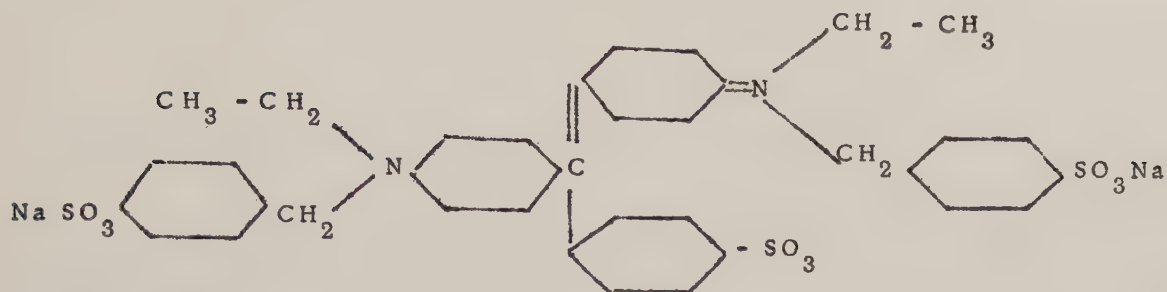
GRASSMANN et HANNIG (31) affirment que ce colorant a l'avantage de se fixer uniformément sur toutes les fractions. Il donne ainsi une coloration intense et régulière des fractions protéiques, mais en même temps un léger fond du papier.

Les lavages se font au méthanol acétique.

c) AZOCARMIN B en solution dans le méthanol acétique



Les travaux de TURBA, EVENKEL (84) et de LÖFFLER et WUNDERLY (49) ont montré que ce colorant se fixe également sur les diverses fractions protéiques, mais le coefficient d'extinction obtenu est faible.

d) LE VERT LUMIERE F.S. ou VERT SULFO

CASPANI et MAGISTRETTI (8) ont préconisé l'emploi de ce colorant en électrophorèse. Il est intéressant par la simplicité de la technique de coloration et par son prix très faible.

Or en 1950, c'est-à-dire dès le début de l'application de la technique, CREMER et TISELIUS (13) ont insisté sur la difficulté d'interprétation d'un électrophorégramme du fait de la différence dans le pourcentage de fixation du colorant sur les diverses fractions.

Actuellement, on connaît parfaitement plusieurs fractions plasmatiques en particulier l'albumine, les gamma-globulines et le fibrinogène (70)

	Groupes basiques	Poids moléculaire
Albumine	99	69.000
Gamma-globulines	155	156.000
Fibrinogène	562	450.000

Les quantités relatives par unité de poids des différentes fractions sont 1,46 , 1 , 1,26 . Cela veut dire que si l'on sature totalement par une réaction stoechiométrique, les groupements basiques des fractions considérées,

par des colorants, pour un poids identique , l'albumine fixera 1,46 fois plus de colorant que les gamma-globulines, et le fibrinogène en fixera 1,26 fois plus comparativement à cette dernière fraction.

APPRECIATION QUANTITATIVE DES FRACTIONS

La mise en évidence des groupements protéiques après la migration électrophorétique se fait de plusieurs manières :

- KOIW, WALLENIIUS et GRONWALL (40) ont utilisé la technique d'absorption dans l'ultra-violet.

- MACHEBOEUF (51) a conseillé de découper l'électrophorégramme en petites bandes et d'éluer ensuite séparément chaque fraction; On pratiquera ensuite un Biuret ou un Biuret sensibilisé par le réactif de FOLIN et CIOCALTEU (21). On terminera par une colorimétrie. Mais plus généralement, les spots protéiques ne sont pas colorés in situ.

- Le plus souvent on procède à l'appréciation des spots de l'électrophorégramme coloré. Quel que soit le type d'appareil, le principe reste toujours le même : La bande de papier est éclairée par une source de lumière aussi régulière que possible, la lumière transmise par la bande est reçue par une cellule photoélectrique qui débite dans un milli-ampèremètre dont les indications sont "pointées" en fonction du déplacement de la bande.

Certains appareils enregistrent directement , c'est-à-dire sans filtre, d'autres nécessitent un filtre coloré dont la longueur d'onde est fonction du colorant utilisé. Les bandes de papier sont photométrées soit à l'état sec, soit imprégnées d'un clarifiant quelconque : Huile de Vaseline, anisol , alpha bromobenzène, méthylsalicylate, soit du mélange à parties égales

d'huile minérale et de bromonaphtalène (69).

Dans leurs études sur les protéinogrammes, AGNERAY et Coll. (1) ont proposé une méthode d'élution en milieu alcalin des différentes fractions protidiques colorées à l'amidoschwartz. Ils préconisent d'effectuer sur chacun des éluats une lecture spectrophotométrique, ou même une lecture automatique à l'autoanalyseur "Technicon" c'est le procédé le plus rigoureux mais aussi le plus laborieux. Il est difficilement applicable dans les analyses courantes.

Si on examine le cas de la photométrie par transparence, qui est d'ailleurs la méthode la plus utilisée (34), il suffit que l'état d'imprégnation ne soit pas uniforme en deux points pour que la proportion de lumière transmise en soit affectée.

La longueur de la fente joue également un rôle important. Elle est en général assez courte, et n'éclaire qu'une faible partie de taches colorées. L'absence d'homogénéité de ces taches colorées fait que l'on obtient des courbes très différentes suivant la partie intéressée par la lecture. Ce fait a été illustré en particulier par PEZOLD et KOFES (67) qui en explorant une même bande dans toute son étendue, ont obtenu une série de courbes différentes, selon les niveaux éclairés.

De plus, il y a toujours une part d'arbitraire dans l'interprétation de la courbe, car les procédés varient avec les auteurs.

Sans entrer dans une discussion qui n'a certainement pas sa place dans cet exposé, on peut presque dire que l'appréciation quantitative d'un électrophorégramme est bien souvent subjective et qu'il vaudrait mieux parfois considérer cet examen comme qualitatif en ne donnant au point de vue quantitatif qu'une simple estimation visuelle.

FACTEURS INFLUENTS SUR LA MOBILITE

L'avantage de cette méthode réside dans sa facilité , sa rapidité, et l'utilisation de faibles quantités de milieu biologique. Elle a permis ainsi de multiplier les recherches sur des liquides biologiques pauvres en protéines qui, jusqu'alors n'avaient pu être étudiés que par quelques rares laboratoires spécialisés.

D'après DREVON (15) , le résultat final dépend de nombreux facteurs: appareils utilisés, nature du tampon, valeur du pH et de la force ionique, intensité et voltage du courant, durée de l'électrophorèse, qualité du papier, nature du colorant, technique de séchage de la bande, méthode d'appréciation de la courbe.

Nous envisagerons les 3 paramètres les plus importants :

- L' Electroendosmose
- Les Solutions Tampons
- Le papier .

a) L' Electroendosmose :

Le papier , imbibé d'une solution tampon , est chargé négativement ; de ce fait, plus le pH de la solution tampon sera élevé, plus la matière du support sera ionisée.

A la surface du papier, les charges vont se fixer immuablement. C'est la solution tampon ,baignant le papier, qui va se déplacer sous l'influence du champ électrique et en sens inverse du déplacement normal des ions protéiques de même signe que ceux fixés au support. Autrement dit, le courant d'électroendosmose se dirigera de l'anode

vers la cathode.

On a démontré que le courant d'électroendosmose était lié au potentiel électrocinétique ξ du support, par l'équation suivante :

$$\xi = \frac{4 \cdot \pi}{i K} \eta \times V$$

K : étant la constante diélectrique

η : la viscosité

x : la conductivité

i : l'intensité du courant

V : le volume correspondant à l'électroendosmose pendant l'unité de temps.

En pratique, quelle que soit la charge du papier, le débit du courant d'électroendosmose décroît en même temps que la force ionique du tampon.

b) Les Solutions Tampons :

Dans le cadre d'études d'ions protéiques, il est préférable d'utiliser des tampons dont le pH est supérieur au point isoélectrique des protéines. Une précaution importante doit être prise lorsque l'on désire maintenir un gradient de potentiel constant sur le papier. Il faut conserver la capacité tampon de la solution au-dessus d'une certaine valeur. On utilise donc en général des solutions ayant une force ionique comprise entre 0,01 et 0,2.

c) Le papier :

Le papier doit être aussi inerte que possible vis à vis des ions

protéiques étudiés. Il doit de plus ne présenter qu'un pouvoir absorbant négligeable et un potentiel électrocinétique très faible.

Le pouvoir absorbant du papier est lié :

- à la possibilité d'échanges ioniques entre les substances soumises à l'électrophorèse et les groupes ionisés constitutifs du support.
- à l'étalement à l'interface support-solution de substances tensio-actives.

Dans les études des ions protéiques, le papier est uniquement porteur de groupes ionisables négatifs, donc on se place dans un domaine où les échanges ioniques possibles sont faibles.

Le pouvoir absorbant du support sera par conséquent minime ; de plus il est à noter que, les protéines ayant un point isoélectrique très élevé, on assiste à une absorption plus ou moins réversible.

3 - TECHNIQUE PROPREMENT DITE

Afin de pouvoir réaliser une bonne standardisation de nos résultats , nous avons toujours utilisé le même mode opératoire.

MATERIELS et REACTIFS

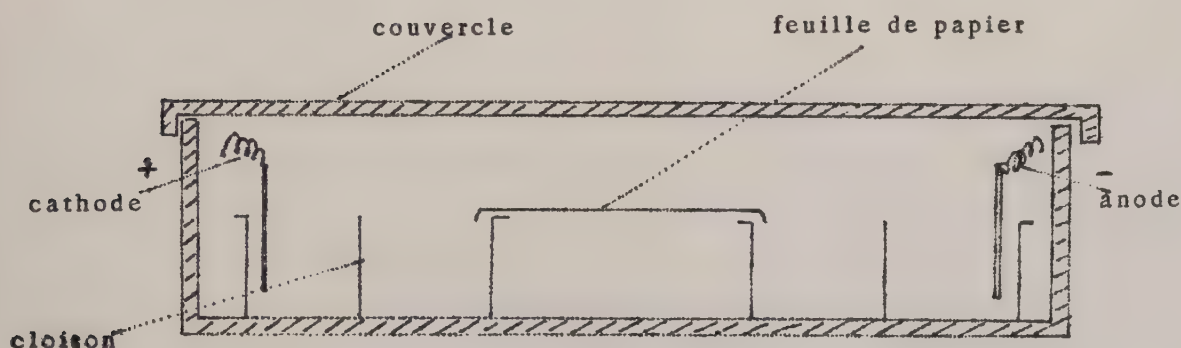
a) La Cuve à électrophorèse : Il existe de nombreux modèles d'appareil. Le montage élémentaire comprend pour chaque enceinte deux bacs à électrodes. Dans chacun de ces bacs, il existe un double compartiment

recevant la solution tampon. Un cloisonnement permet d'éviter la trop grande variation de pH du tampon au niveau de la feuille. Dans les compartiments extrêmes se trouvent les électrodes en platine. Un couvercle limite l'évaporation (fig. 3).

De plus, le bac doit avoir une contenance suffisamment grande afin d'éviter les modifications du pH qu'induit le passage du courant dans la solution conductrice.

Figure 3

Schéma représentatif d'une enceinte d'électrophorèse



Les détails techniques que nous venons de décrire s'appliquent aussi bien à l'électrophorèse sur papier qu'à l'immuno-électrophorèse.

b) Le REDRESSEUR de courant : Il fournit la tension continue indispensable à la migration électrophorétique.

Ce redresseur doit posséder un dispositif permettant de régler le voltage suivant le nombre d'électrophorèse à effectuer en série.

En général, il y a avantage à avoir une tension très forte et une intensité très faible, ce qui réduit le phénomène d'évaporation : 110 volts et 2 milliampères correspondent à une bonne séparation.

L'électrophorèse est conduite à la température du laboratoire.

c) Le SUPPORT INERTE

Nous utilisons le papier SCHLEICHER et SCHULL 2043 a Mgl sous forme de bande de 31,5 cm de long sur 4 cm de large.

d) Le TAMPON

Un tampon veronal à pH 8,4 force ionique 0,1.

d) Les COLORANTS

- Comme pour la révélation des protéinogrammes sériques, deux sortes de colorants sont utilisés :

- . Solution d'Amido Schwartz
- . Solution de Vert Lumière.

- Pour la coloration des lipoprotéines : suivant la méthode de SWAHN (80), nous utilisons le Noir Soudan à saturation dans l'éthanol à 60°

NOIR Soudan	500 mg
Ethanol à 60°	500 ml

Il faut effectuer une ébullition pendant vingt minutes dans un ballon muni d'un réfrigérant à reflux, puis filtrer après le refroidissement. Le colorant filtré doit être conservé à +4°.

MODE OPERATOIRE

A une distance de neuf centimètres de l'extrémité de la bande de papier, on trace au crayon un trait de deux centimètres de long qui sert de point de repérage pour le dépôt du substrat protéique.

La bande ainsi préparée est ensuite imbibée de solution tampon veronal, et essorée immédiatement entre deux feuilles de papier filtre. Sans attendre la dessiccation, la bande humide est tendue sur le support en plexiglass de l'appareil. Afin de faciliter son adhérence et réaliser une tension maximum, les extrémités de la bande sont humectées de tampon.

La bande est placée de telle manière que le trait "repère" soit situé à trois centimètres du bord libre du support.

Quarante microlitres de la préparation protéique sont déposés à l'aide d'une micropipette d'hématologie sur le trait repère. L'étalement sera homogène si l'on promène doucement l'extrémité de la micropipette au contact du papier.

Nous préférons personnellement la méthode dite "à sec" pour le dépôt du substrat protéique. Sur la bande sèche, on dépose quarante microlitres de la préparation, on laisse sécher à l'air libre pendant 15 minutes. On plonge ensuite la bande dans la solution conductrice et on laisse égoutter. On essore rapidement entre deux feuilles de papier filtre avant d'étendre la bande sur le support de l'appareil à électrophorèse.

Pour obtenir un étalement parfaitement homogène, le dépôt "à sec" peut être fait soit avec une micropipette, soit avec une lame "rodée". Dans ce dernier cas on opérera comme suit.

Quarante microlitres du substrat protéique sont déposés sur l'extrémité rodée d'une lame pour examen microscopique. On applique alors franchement cette extrémité sur la feuille de papier sèche au niveau du trait de crayon.

Afin de réaliser une bonne séparation des spots protéiques il faut éviter la formation de bulles d'air qui pourraient être retenues sous le papier au contact du support.

La migration s'effectue sous une tension de 6,5 volts par cm et la différence de potentiel entre les deux extrémités horizontales du support est ajustée à 110 volts pour une durée de 10 heures.

Une fois la séparation électrophorétique terminée, la bande est séchée à la température du laboratoire tout en la laissant horizontale sur le support.

Pour la révélation des protéinogrammes, la bande sèche est plongée dans un bain de Vert Lumière pendant quinze à vingt minutes. Le lavage s'effectue avec de l'eau acétique à 2%. Après 5 à 6 lavages on doit s'assurer que l'eau acétique du dernier bain est incolore. On rince enfin la bande à l'eau distillée avant de sécher à l'étuve à 100°.

Pour l'Amido-Schwartz 10 B, les lavages s'effectuent avec du méthanol acétique.

La coloration des lipoprotéines se fait avec la solution saturée de Noir Soudan filtrée, pendant six heures. Trois lavages à l'alcool à 50% suffisent pour la décoloration.

Pour chaque Protéinogramme ou Lipidogramme, nous avons effectué un témoin avec du Sérum Humain.

Quant à la méthode de lecture, nous avons utilisé le densitomètre enregistreur intégrateur double faisceau "CHROMOSCAN" (*) dans lequel la mesure se fait par "réflexion".

L'appareil comporte un système de double faisceau lumineux dans lequel la lumière provenant d'une source unique est partagée alternativement, au niveau du miroir tournant, en deux faisceaux et recombinaison sur la cathode d'un photomultiplicateur unique. Si les deux faisceaux ont des intensités différentes, il se produit un signal dont la fréquence dépend du rythme d'extinction.

Le système d'intégration est basé sur la loi de SIMPSON :

pour une très petite variation de distance en abscisse, la surface déterminée par une courbe est directement proportionnelle à l'ordonnée.

Les impulsions obtenues sont dirigées vers un compteur numérique décimal.

Dans le cadre d'études sur l'athérosclérose, les analyses par électrophorèse libre des protéines solubles de l'aorte humaine ont été réalisées par J. FREY (22). Nous croyons cependant utile d'envisager brièvement le principe et la description de cette méthode.

III - ELECTROPHORESE LIBRE ou " MOVING BOUNDARY METHOD "

(77) (79) (81) (82)

PRINCIPE

Le principe de l'électrophorèse libre, appelée encore électrophorèse de

(*) : Etablissements JOYCE LOEBL FRANCE - 34, Avenue de Verdun - SURESNES (Seine)

frontière, électrophorèse en cellule ou en veine liquide est le suivant :

Dans une cellule de verre en U , à faces parallèles, on place grâce à un dispositif approprié permettant d'éviter le mélange des milieux, d'une part une solution de protéines et d'autre part une solution d'électrolytes de pH et de force ionique déterminée. Une électrode impolarisable est reliée à chacune des branches de la cellule. Dans ces conditions il apparaît avant tout passage de courant une ligne de séparation ou "frontière" en la solution d'électrolytes et la solution protéique.

Au passage du courant électrique et au pH utilisé, les particules chargées négativement, se dirigent vers l'anode avec une vitesse qui est fonction de leur charge et du champ électrique.

Si la solution contient plusieurs composants protéiques de charges différentes, chacun de ces composés se déplacera et il y aura apparition pour chacun d'entre eux d'une "frontière" caractéristique.

Grâce à un dispositif optique approprié, on peut repérer ces différentes frontières qui correspondent à des indices de réfractions déterminés.

Les faisceaux lumineux sont reçus soit sur une plaque photographique, soit sur un écran.

L'utilisation d'une fente oblique, captant latéralement les rayons déviés permet d'obtenir l'image d'une courbe dans laquelle il existe une proportionnalité entre la hauteur et la concentration de chaque fraction.

DESCRIPTION de l' APPAREIL

L'appareil comprend :

a) Une cellule en verre à faces parallèles, optiquement définies; les

premières cellules utilisées étaient cylindriques. Mais pour favoriser les échanges thermiques, on a adopté des cellules à section rectangulaire, qui ont l'avantage de ne pas provoquer la déviation des rayons lumineux qui les traversent quand on utilise un mode d'observation optique.

Ces cellules sont constituées de 3 ou 4 sections indépendantes pouvant se glisser l'une par rapport à l'autre sur des faces horizontales. Ces parties sont assemblées par des plans de verre rodés. La cellule analytique est liée par des rodages ou des joints en caoutchouc aux vases à électrode.

b) Des vases à électrodes contenant des électrodes impolarisables du type $\text{AgCl} - \text{NaCl}$ pour éviter le phénomène de convection thermique.

En pratique, l'électrode proprement dite est constituée d'un peloton d'argent vierge (18) plongeant au fond d'un vase. Il est recommandé d'inverser leur polarité afin de conserver ces électrodes en bon état.

c) L'ensemble est maintenu dans un cadre métallique comportant les dispositifs de servo-commande du déplacement des segments de cellule.

d) Le tout est immergé dans un bain, réglé à $+4^\circ$. A cette température, les variations de densité des fractions soumises à l'électrophorèse dues à l'effet joule sont réduites au minimum.

e) Un dispositif optique adéquat permet de suivre sur un verre dépoli l'évolution de l'électrophorèse (50). L'appareil est complété de plus par une circulation d'air sec autour des pièces optiques.

ETUDE COMPARATIVE DE L'ELECTROPHORESE SUR PAPIER

et de l'ELECTROPHORESE LIBRE

L'électrophorèse sur papier possède, par rapport à l'électrophorèse dite de Tiselius, les différences suivantes (40-77) :

- a) La migration des molécules protéiques soumises à un champ électrique dans un tube en U plein de solution tampon est remplacée par une migration sur une bande de papier filtre imbibée d'une solution conductrice, entre deux électrodes.
- b) Une séparation partielle a lieu dans le tube en U, donc seules les fractions de composants ayant la migration la plus rapide ou la plus lente peuvent être obtenues pures. L'électrophorèse sur papier rend possible une séparation totale des composants, de plus elle exige des quantités de sérum très faibles (0,01 à 0,02 ml) et acquiert ainsi le caractère d'une microméthode.
- c) L'enregistrement optique continu de l'évolution de l'électrophorèse libre est, dans l'électrophorèse sur papier, remplacé par une lecture simple et rapide du résultat final.
- d) Les protéines coexistent avec certaines molécules lipidiques, glucidiques et même certains métaux, et la méthode de frontières, basée uniquement sur les différences d'indice de réfraction, ne permet pas d'étudier et d'individualiser chacun des composants de ces "complexes glucido, lipido, et métalloprotéiques".
- e) Le résultat d'une électrophorèse sur papier est révélé au moyen de la coloration de la substance examinée dans la bande. Cette coloration étant basée sur les principes histochimiques. La quantité de colorant fixée est dans une certaine relation avec la quantité de substance examinée.

IV - IMMUNO - ELECTROPHORESE

1) GENERALITES

Parmi les nombreuses méthodes , permettant d'analyser un mélange de protéines, et de séparer les unes des autres à un état voisin de la pureté , nous venons de voir que l'électrophorèse présentait un certain intérêt grâce à son pouvoir de résolution. On peut utiliser par ailleurs les réactions immunologiques qui sont d'une spécificité remarquable.

GRABAR et WILLIAMS (29) ont eu les premiers le mérite de combiner ces deux techniques, ce qui permet de compenser les inconvénients de l'une par les avantages de l'autre.

Ainsi est née l'immuno-électrophorèse qui représente l'association de l'électrophorèse en milieu gélifié, technique décrite pour la première fois par GORDON et Coll. (25) en 1950, avec la technique immunologique en milieu gélifié mise au point par OUCHTERLONY (64).

Nous allons envisager successivement :

L'étude de la théorie de l'immuno - électrophorèse

L'étude de la technique proprement dite

Les avantages de l'immuno - électrophorèse.

2) ETUDE DE LA THEORIE DE L' IMMUNO - ELECTROPHORESE

PRINCIPE

Le principe de la méthode consiste à introduire dans la plaque de gélose

le mélange protéique à étudier et à soumettre cette préparation à un champ électrique. On laisse ensuite diffuser les immun-sérums sur la même plaque.

La migration du substrat protéique s'effectue dans le sens de la longueur de la plaque de gélose et la diffusion de l'immun-sérum s'effectue à partir d'une gouttière, creusée longitudinalement dans le sens perpendiculaire à la ligne de migration des fractions protéiques.

Chaque antigène en diffusant radialement autour de son point de départ, rencontrera s'il est présent son anticorps homologue. Il se produira alors une série d'arcs de précipitation.

L'immuno-électrophorèse permet ainsi une double identification des protéines. D'abord on assiste à une sélection basée sur les mobilités électrophorétiques, ensuite à une identification immuno-chimique.

ETUDE DES REACTIONS ANTIGENE - ANTICORPS

Si on injecte à un animal, par voie parentérale, une substance étrangère, on assiste après un certain temps à la formation à l'intérieur de l'organisme, d'une substance neutralisante que l'on peut retrouver dans le sérum sanguin.

Le corps agresseur porte le nom d' A N T I G E N E et le produit neutralisant élaboré est nommé A N T I C O R P S.

a) ANTIGENE :

Il a été admis que la plupart des antigènes sont de nature protéique mais MORGAN (62) et BOIVIN (6) ont reconnu des antigènes de nature glucidique ou glucidolipidique.

La spécificité de l'antigène est liée à l'existence d'un groupement ou de plusieurs groupements déterminants qui forment le motif antigénique ou HAPTENE (71).

b) ANTICORPS :

Ils appartiennent en général aux gamma globulines, substances élaborées par les lymphocytes et les plasmocytes de l'organisme animal, après l'agression par une substance étrangère.

Il existe sur cette substance neutralisante isolée un groupement spécifique auquel on donne le nom de "MOTIF SPECIFIQUE" (55).

Si l'on met en présence, dans une série de tubes de KAHN, une quantité fixe d'anticorps et des quantités croissantes d'antigène, il apparaît, à une dilution donnée, un phénomène de zone. C'est la zone d'équivalence de HEIDELBERGER et KENDALL (36) dont le centre est "le point d'équivalence". Dans cette zone la réaction est presque stoechiométrique.

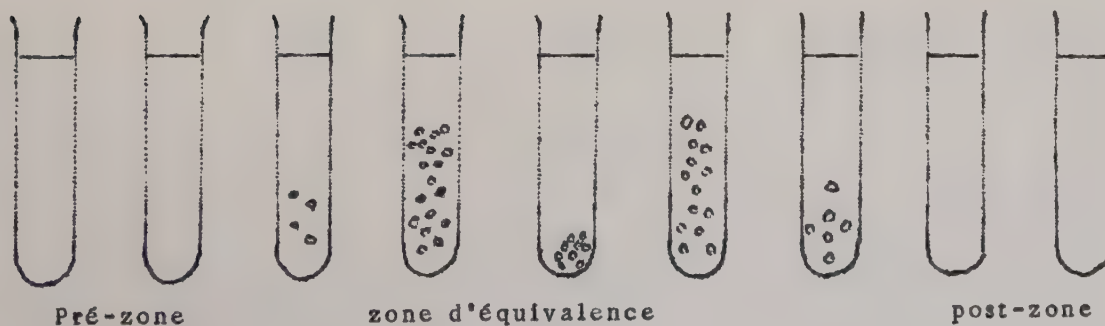
On peut observer ainsi trois zones (figure 4): :

- pré-zone
- zone d'équivalence
- post-zone.

Figure 4

Schéma représentatif d'une réaction Ag - Ac

D'après DR BOISSEZON (14)



- Pré-zone :

Dans cette zone , l'anticorps (Ac) se trouve en excès et la précipitation est nulle.

- Zone d'équivalence :

C'est dans cette partie de la gamme que le précipité est maximum d'où l'on a une réaction stoechiométrique.

- Post-zone :

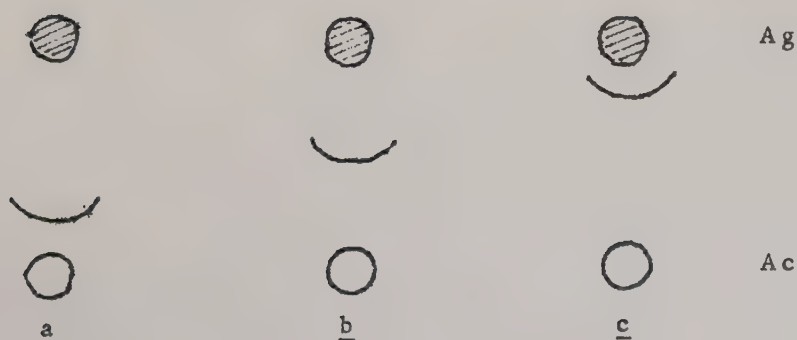
Quand il y a excès d'antigène (Ag) la précipitation est incomplète et même nulle.

En pratique, la position de l'arc de précipitation nous indique avec netteté si les quantités d'antigène et d'anticorps sont dans le rapport d'équivalence. On a (figure 5) :

- soit l'arc de précipitation à mi-distance des deux réservoirs si l'équivalence est respectée(b),
- soit un arc de précipitation plus rapproché ou plus éloigné (a-c) selon qu'il existe un défaut ou un excès de l'un des deux constituants.

Figure 5

Schéma représentatif de l'influence de la quantité d'Ag sur la situation d'arc de précipitation d'après De BOISSEZON; la quantité d'Ac est constante.



- a - il y a excès d'Ag
- b - Il y a équivalence, l'arc de précipitation se trouve à mi-chemin des deux réservoirs.
- c - L'arc de précipitation se rapproche du réservoir d'Ag, donc défaut d'Ag.

PREPARATION des IMMUN - SERUMS

Parmi de nombreuses méthodes de préparation des immun-sérums, deux sont actuellement très utilisées.

a) Méthode de GRABAR et Coll. (28)

Chaque lapin , avant toute immunisation, est ponctionné de façon à pouvoir utiliser le sérum comme sérum témoin.

On pratique pendant quatre semaines, une seule injection par semaine de préparation antigénique mélangée à de l'huile de paraffine et à un émulsionnant tel que l' AQUAFON. La première injection est de 2 ml, la seconde de 3 ml, la troisième de 4 ml, la quatrième et dernière de 5 ml.

Les lapins ainsi immunisés sont ensuite saignés après un mois d'attente, les immun -sérums stérilement recueillis sont conservés à la glacière après addition de merthiolate de Na à la concentration de 1/10.000.

b) Méthode de LAPRESLE (43)

L'immunisation a lieu 4 fois par semaine pendant 3 semaines de suite. La quantité injectée va en croissant de la première semaine à la troisième semaine.

Les lapins sont saignés à blanc 8 jours après la dernière injection. Les sérums recueillis sont conservés de la même manière que dans la méthode précédente.

Les préparations des immuns-sérums présentent toujours quelques difficultés. Le nombre et la quantité d'anticorps précipitants formés chez les animaux immunisés avec un mélange complexe d'antigènes dépendent de nombreux facteurs dont les plus importants sont les suivants :

- Réponse variable de l'animal fournisseur d'immun-sérum. La préparation ne semble possible qu'avec certaines espèces telles que : cheval, mulet, bouc.

Le lapin, mauvais producteur d'anticorps, n'est utilisable que si l'on désire obtenir de petite quantité d'immun-sérum spécifique pour les recherches.

- La quantité de préparation antigénique à injecter varie d'un animal à l'autre et surtout d'une méthode à l'autre.
- Suivant la technique d'immunisation utilisée, la forme sous laquelle l'antigène est introduit chez l'animal est variable : on utilise soit une solution dans le sérum physiologique, soit un mélange ou une suspension avec des adjuvants tels que mélange de FREUND , soit une préparation spéciale après absorption sur alumine.
- La périodicité des injections varie suivant l'espèce animale utilisée.
- La voie d'injection est variable : voies intra-veineuse, intramusculaire, ou intra-péritonéale.

ETUDE DE LA GELOSE ou " AGAR - AGAR "

La gélose ou agar - agar a été proposée pour la première fois comme support dans l'étude électrophorétique des protéines, dès 1907, par C.W. FIELD et O. TEAGUE (19).

L'étude détaillée ainsi que le développement de cette méthode n'ont été réalisés qu'en 1949 par GORDON et Coll. (25).

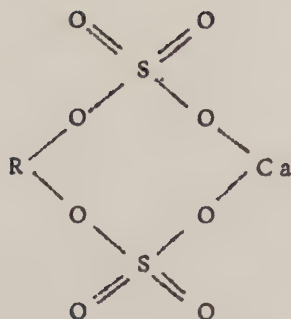
L'agar-agar est un mélange de polyosides provenant des extraits d'un certain nombre d'algues (Phéophycées). Sa préparation comprend : une dessiccation, un blanchiment, un traitement par les acides, enfin des lavages à l'eau ammoniacale.

Au point de vue macroscopique, l'agar-agar se présente soit sous forme de filaments, soit sous forme d'une poudre blanche parfois colorée légèrement en jaunâtre ; insoluble dans l'eau froide, ce produit ne devient soluble que dans l'eau bouillante en donnant une solution plus ou moins visqueuse qui, par refroidissement, forme un gel rigide.

La teneur maximum en gélose nécessaire pour l'obtention d'un tel gel oscille entre 0,5 à 2 g%.

La formation d'un gel par les solutions d'agar-agar s'explique par la nature polyosidique de ses composants: alginates, carragénates, galactanes (14). Ces polymères, de poids moléculaire important 180.10^3 , peuvent former un réseau tri-dimensionnel entraînant cette rigidité.

La présence en quantité notable de Sulfate de Calcium dans les cendres semble être due à l'existence d'esters sulfuriques répondant à la formule suivante :



où R représente une longue chaîne polysidique .

Les groupements SO_4 fixes, présents dans le gel de gélose, peuvent créer un flux d'électroendosmose par la formation d'un potentiel électrocinétique de contact, ce qui aura pour effet d'entraîner un déplacement rétrograde des protéines de faible mobilité électrique telles que les gamma et bêta globulines. Les positions relatives des différentes protéines resteront cependant en rapport avec la mobilité électrique et il n'en résulte qu'une diminution de l'espace à parcourir par rapport au support, ce qui constitue un phénomène plutôt favorable.

3 - TECHNIQUE PROPREMENT DITE

Les techniques d'immuno-électrophorèse actuellement utilisées sont d'une part celle de GRABAR et WILLIAMS(29) qui est une macrométhode, et d'autre part celle de SCHEIDDEGGER (72-73-74-75) ou microméthode. Ces deux techniques sont semblables dans leur principe et leur réalisation, la seule différence notoire est la taille des plaques de gélose utilisées, ce qui entraîne des variations évidentes de la quantité des réactifs employés, de la durée de la migration électrophorétique et du temps de diffusion.

Mais quelque soit la méthode envisagée , les fractions protéiques ,

séparées en premier temps par électrophorèse, vont diffuser et rencontrer à certains niveaux leur anticorps homologue. L'arc de précipitation se formera en un endroit déterminé, qui est fonction de la vitesse de diffusion de l'antigène et du rapport quantitatif du couple Antigène - Anticorps.

La place du trait de précipitation, d'autant plus proche de la source de l'un des réactifs qu'il y a excès de l'autre, et même éventuellement sa formation et sa redissolution dépendent des proportions respectives en anticorps et en antigène. Selon l'équilibre du couple Ag-Ac, on assiste à plusieurs phénomènes : dans certains cas, l'excès de substrat antigénique entraîne la redissolution et la disparition rapide et totale de l'arc de précipitation, ou au contraire son épaississement. Dans d'autres cas, une quantité insuffisante empêche le trait de se former.

Nous avons essayé de schématiser la technique d'immuno-électrophorèse dans la figure 6. (figure 6 page 46).

Nous avons adopté pour l'étude immuno-électrophorétique des homogénats de tissus aortiques, la "microméthode" de SCHEIDDEGGER (72), se pratiquant sur lame d'hématologie. Elle permet comme son nom l'indique de ne mettre en oeuvre que des quantités réduites de gélose, de substrat antigénique et d'immun-sérum. L'avantage principal de la méthode réside surtout dans un temps de réalisation assez bref.

- REACTIFS

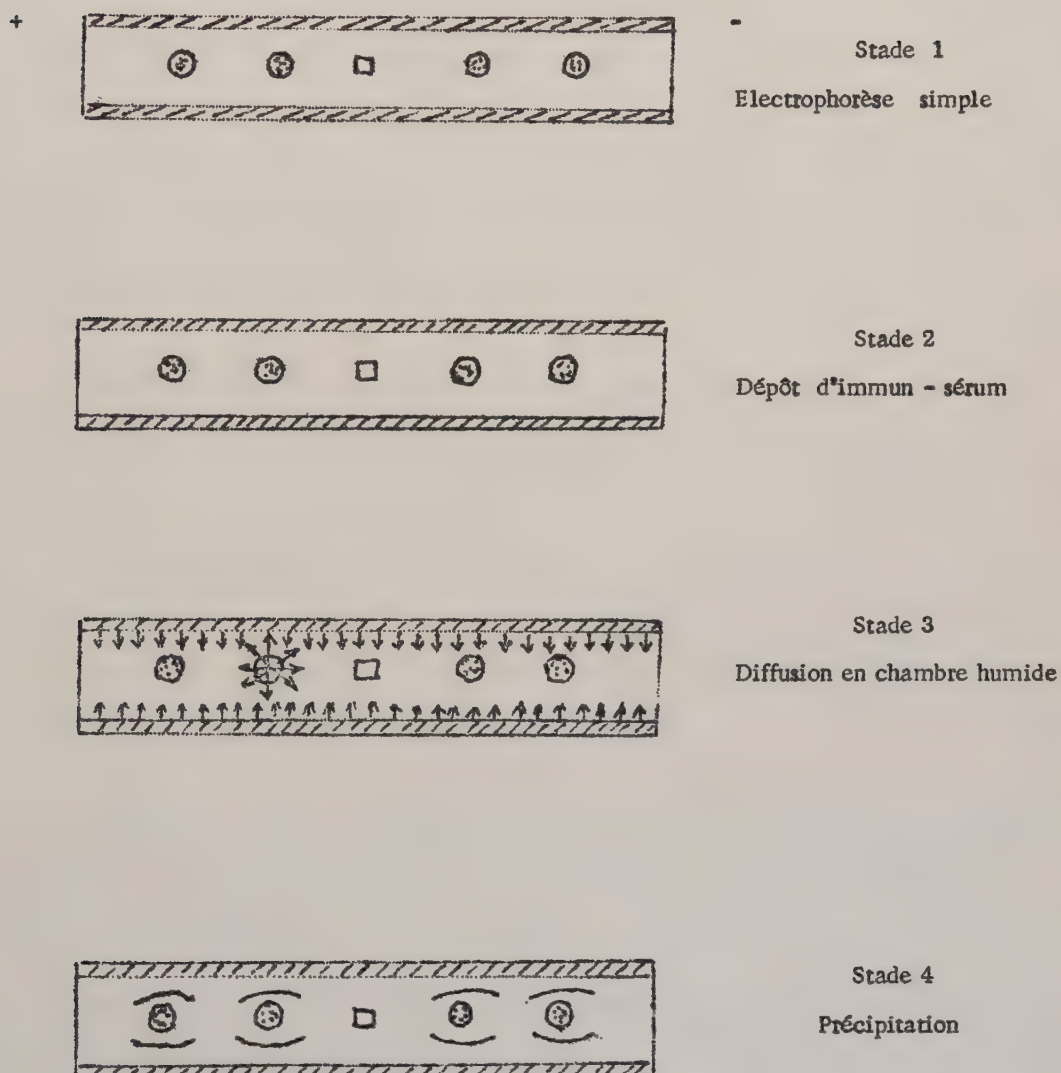
. Gélose purifiée (*) :

. Gélose sans sel à 2% :

gélose purifiée	2 g
Eau distillée	100 g
Merthiolate de Sodium 10%	11 gouttes

Figure 6

Représentation schématique des quatre phases
essentielles de l'immuno-électrophorèse



. Gélose tamponnée à 2% :

Gélose purifiée	2 g
Tampn véronal à pH 8,4	50 ml
Eau distillée	50 ml

La préparation de la gélose sans sel ou de la gélose tamponnée se fait simplement dans une fiole d'Erlenmeyer de 500 ml. On prend soin toutefois de recouvrir le col avec un entonnoir afin de minimiser l'évaporation due au chauffage .

On laisse bouillir en agitant de temps à autre jusqu'à dissolution complète de la gélose, ce qui demande environ 10 à 20 minutes, puis on laisse refroidir vers 50° C avant de couler sur les lames ou dans les tubes de réserve.

Afin d'éviter la dégradation de la gélose par des chauffages répétés , nous disposons dans de petits tubes à essais en pyrex des quantités de gélose juste suffisantes pour faire un nombre déterminé de plaque de gélose.

Pour plus de précautions, le gel refroidi dans les tubes à essais est conservé à la glacière.

. Solutions tampons :

Nous utilisons pour la préparation de la gélose tamponnée le tampon véronal sodique pH 8,4 force ionique 0,1 identique à celui utilisé pour l'électrophorèse sur papier.

On peut employer pour la migration immuno-électrophorétique l'une des quatre solutions tampon suivantes :

a) Tampon phosphate

$\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	68 g
KH_2PO_4	0,64 g
Eau distillée q.s.p.	1000 ml
pH	= 7,5
force ionique	= 0,1

b) Tampon à la triéthanolamine

Triéthanolamine H Cl	11,9 g
Na OH N/I	26 ml
Eau distillée q.s.p.	1000 ml
pH	= 7,6
force ionique	= 0,1

c) Tampon véronal sodique :

Veronal sodique	17 g
H Cl N	23,5 ml
Eau distillée q.s.p.	1000 ml
pH	= 8,4
force ionique	= 0,1

d) Tampon à l'acide borique

Acide borique	11,1 g
Na OH N/I	93 ml
Eau distillée q.s.p.	1000 ml
pH	= 8,4
force ionique	= 0,1

Il s'agit là des solutions mères. Au moment de l'emploi, on les dilue

avec un égal volume d'eau distillée.

Nous avons essayé aussi le tampon TRIS-E.D.T.A. (68):

Acide borique	4,6 g
TRIS (trihydroxyméthylaminométhane)	60,5 g
E.D.T.A.	6 g
Eau distillée q.s.p.	1000 ml

mais celui-ci donne des résultats identiques en immuno-électrophorèse à ceux obtenus avec le tampon véronal sodique.

Afin de standardiser toutes nos expérimentations, nous n'avons utilisé que le tampon véronal sodique à pH 8,4 et force ionique 0,1.

. Colorants

Nous utilisons les mêmes colorants que ceux de l'électrophorèse sur papier :

- Solution d'Amido Schwartz
- Solution de Vert Lumière

La décoloration de fond est pratiquée simplement avec l'eau acétique à 2% pour les plaques colorées aussi bien avec la solution acétique de Vert Lumière qu'avec celle d'Amido Schwartz.

MATÉRIEL

- . Une enceinte à électrophorèse constituée de deux bacs à électrodes

dont la distance est fonction de la plaque de verre. Elle est la même que celle utilisée pour la réalisation des électrophorèses.

. Un générateur de courant continu et stable (figure 7)

L'appareil est constitué d'un voltmètre et d'un ampèremètre. Il a une capacité autorisant la conduite de plusieurs séries d'analyses simultanées.

Pour obtenir, en gélose, une dispersion électrophorétique maximum des constituants du mélange antigénique, on aurait intérêt à avoir un voltage aussi élevé que possible. Cependant le dégagement de chaleur produit par le passage du courant continu, dessèche la couche de gélose qui se fend et limite l'emploi d'un haut voltage. Nous avons constaté qu'une différence de potentiel de l'ordre de 4 à 5 volts par cm donne de meilleurs résultats.

. Lame de verre de format standard 26 x 76 mm :

On dégraisse au préalable les lames d'hématologie neuves par alcool-éther. Elles sont ensuite recouverte d'une couche de gélose sans sel (environ 2 ml de gélose fondue au bain-marie). Grâce à cette précaution, la couche de gélose tamponnée attachera mieux au verre.

. Une enceinte humide :

Elle est constituée simplement par des boîtes de Pétri de grande dimension, tapissées intérieurement de plusieurs épaisseurs de papier filtre humecté d'eau renfermant un antiseptique (merthiolate de sodium à 1‰). La boîte est munie d'un système de support formé de baguettes de verre, permettant de déposer les lames en position parfaitement horizontale.

. Emporte-pièce : (figures 8 et 9)

L'appareil que nous avons utilisé a la forme d'une "petite guillotine".
Il comporte :

- un socle fixe assurant le maintien de la lame gélosée
- et une partie mobile en matière plastique, ce bloc est muni de lames de rasoir, peut s'insérer dans les glissières, et s'abaisser au dessus de la lame préparée.

Tout ceci assure une disposition constante et stable, indispensable à une bonne reproductibilité.

Nous avons utilisé deux types de blocs mobiles :

- Type 1 : quand on veut étudier simultanément deux substrats avec un même antiserum.

Deux lames de rasoir ordinaires sont séparées entre elles par une cale de 1 mm, et de part et d'autre se trouvent deux orifices de 1mm de diamètre permettant aux trocards à extrémité tronquée de pratiquer des réservoirs dans la couche de gélose.

- Type 2 :

Quatre lames de rasoir permettent de réaliser deux fentes longitudinales de part et d'autre du réservoir central. Le trou central destiné au mélange protéique se trouve à 5 mm des lames de rasoir.

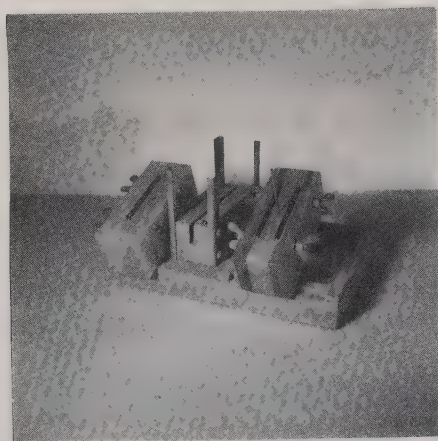
Figure 7

Générateur de courant continu - Cuve à électrophorèse
et immuno-électrophorèse.



Figure 8-9

Emporte-pièce



8

9

8 - Appareil type 1

9 - Appareil type 2

TECHNIQUE

L'immuno-électrophorèse se réalise en deux temps :

1er temps : Electrophorèse en gélose

2ème temps : Diffusion et précipitation.

a) Electrophorèse en gélose :

Les lames neuves dégraissées et couvertes d'une pellicule de gélose sans sel vont ensuite recevoir 2 ml de gélose tamponnée fondue.

Pour avoir un gel aussi uniforme que possible, il est préférable d'utiliser des solutions de gélose très chaudes et entièrement fondues. 2 ml de gélose fondue sont déposés , à l'aide d'une pipette chaude , sur les plaques de verre parfaitement horizontales et donnent une épaisseur de 2 mm après refroidissement.

Sans attendre plus longtemps, on découpe les divers réservoirs à l'aide des emporte-pièces. On pratique le "trou" du dépôt de substrat antigénique à l'aide d'un trocard de 1 mm de diamètre. On aspire et on retire d'un coup sec en faisant en sorte de ne point déchirer la couche de gélose. Après avoir placé la goutte de solution protéique dans ce trou de 1 mm de diamètre et 1 mm de profondeur, tout en vérifiant qu'il n'y a pas de bulles d'air, on ferme cet orifice en coulant de la gélose à une température d'environ 45 à 48°C.

- A quel endroit de la gélose doit-on effectuer ce dépôt ?

Après des essais préliminaires, en tenant compte de la concentration de la gélose, du pH, de la force ionique de la solution conductrice et surtout de la force d'électroendosmose, nous avons choisi de pratiquer le trou à la partie centrale de la lame.

- Quelle est la quantité de substrat protéique utilisé ?

La quantité des protéines solubles de l'aorte à introduire est déterminée par les conditions opératoires : on sait que chaque orifice représente un volume de 1 mm^3 environ.

Le taux des protides totaux des extraits protéiques est faible. Il faut donc remplir plusieurs fois la logette de départ en prenant soin chaque fois de laisser diffuser le liquide entre chaque "charge" dans une atmosphère saturée en vapeur d'eau afin d'éviter la dessiccation de la gélose.

Nous avons constaté de plus qu'il est absolument nécessaire de laisser en place la gélose de la gouttière pour l'immun-sérum afin d'éviter le phénomène de distorsion qui se produirait par effet Joule lors de la migration.

Les dimensions de cette gouttière sont fonction du type d'électrophorèse pratiqué. Dans tous les cas la longueur doit être égale au déplacement des protéines sous l'effet du champ électrique, la largeur pour la microméthode est fixée à 1 mm.

Une fois les lames placées sur le support en plexiglass, nous réalisons la connection avec la solution conductrice : le pont conducteur est une feuille de papier Whatmann épais, de 25 mm sur 7 cm, imprégnée de tampon véronal. Elle relie le bord de la lame gélifiée avec le tampon contenu dans le bac à électrophorèse. Il est nécessaire, chaque fois, de s'assurer qu'il n'existe pas de bulles d'air entre la feuille de papier et la couche de gélose.

Le champ électrique sur le gel est réglé de telle manière qu'il corresponde à 6 volts par cm.

La température à laquelle est effectuée l'électrophorèse a certainement une influence. Certains auteurs préconisent une réfrigération

pendant la migration électrophorétique (85-86-87) mais l'expérience nous a montré que les résultats restent satisfaisants en opérant à la température du laboratoire, sans précautions spéciales.

b) Temps de diffusion et de précipitation

Après 50 minutes de migration, les lames débarrassées du pont conducteur sont placées sur un support parfaitement horizontal. On enlève alors la gélose des gouttières destinées à recevoir les immun-sérums.

Dépôt des immun-sérums :

Certains auteurs (30) préconisent de mélanger préalablement l'immun-sérum à la gélose fondue. Le complexe est coulé immédiatement dans les gouttières vidées de gélose à la fin de l'opération de séparation électrophorétique.

Mais nous avons constaté que l'emploi de l'immun-sérum liquide assure une diffusion rapide des anticorps et de ce fait les précipitations spécifiques apparaissent plus tôt.

La diffusion s'effectue en vingt-quatre heures en chambre humide à température constante, afin d'éviter les artefacts dûs au dessèchement de la gélose et le dédoublement des lignes de précipitation causé par les variations brusques de la température.

La précipitation est complète en vingt-quatre heures pour la micro-méthode.

Les lames sont ensuite lavées avec du sérum physiologique à 9% dans plusieurs bains pendant vingt-quatre heures afin d'enlever l'excès

d'immun-sérum qui prendrait la coloration. Ce lavage, non seulement indispensable pour enlever les protéines non précipitées, a de plus l'avantage d'accentuer le contraste et la finesse des traits de précipitation dont certains n'apparaissent même qu'au cours de ce lavage.

Afin d'enlever les sels qui pourraient cristalliser et rompre par la suite le film d'agar, on pratique trois lavages, à 10 minutes d'intervalle, à l'eau distillée.

c) Séchage des lames

Il faut noter avant tout que les arcs de précipitation spécifiques obtenus dans l'immuno-électrophorèse n'ont pas besoin d'être fixés.

Le séchage s'effectue au moyen de l'artifice technique décrit par URIEL et SCHEIDDEGGER (87). Il permet d'éviter les déformations et les craquelures du gel pendant le séchage: l'opération consiste à couvrir le gel encore humide avec une feuille de papier filtre tout en évitant soigneusement la présence de bulles d'air. Ce système conduit à une dessiccation graduelle et régulière. Le papier filtre absorbe en outre les sels qui pourraient cristalliser dans le gel.

Le séchage se fait à la température du laboratoire, car une élévation de température supérieure à 37° risque d'entraîner une dénaturation du film de gélose.

Une fois la plaque complètement desséchée, le papier est décollé, les quelques fibres de cellulose restant adhérentes à la lame sont enlevées facilement en frottant les lames avec le doigt sous un courant d'eau.

d) Coloration :

Vus par transparence, les traits fins et blanchâtres de précipité du

complexe Ag-Ac seront colorés pour l'interprétation.

La coloration se fait en immergeant les lames pendant 20 minutes dans le bain d'Amido Schwartz IO B.

La décoloration du fond de la lame se fait en la maintenant pendant 10 minutes dans 4 ou 5 bains d'eau acétique à 2%.

Puis on termine par un lavage à l'eau distillée et les plaques sont séchées à l'air libre.

Les traits de précipitation apparaissent colorés en bleu.

c) Appréciation des résultats:

A l'heure actuelle, la méthode n'est pas quantitative.

GRABAR et WILLIAMS (30) font des photographies par simple contact entre la lame de gélose et un papier ou un film sensibles.

Nous avons recours en général :

- soit à un dessin au trait en suivant les projections à l'agrandissement direct de la lame colorée.
- soit à un agrandissement photographique.

4 - AVANTAGES DE L'IMMUNO-ELECTROPHORESE

L'immuno-électrophorèse présente sur l'électrophorèse libre ou en veine liquide l'avantage de la rigidité du milieu, ce qui évite des mouvements de convection thermique.

Par rapport aux autres supports tel que le papier ou acétate de cellulose, la gélose présente l'avantage de sa haute teneur en eau et de sa transparence. Elle ne semble pas avoir un pouvoir de rétention important vis-à-vis des protéines à étudier.

Donc la méthode immuno-électrophorétique complète de façon indéniable l'électrophorèse sur papier ; elle permet une étude plus précise et plus approfondie d'un mélange pauvre en protéines grâce à sa haute spécificité et à une dissociation remarquable des diverses fractions protéiques étudiées.

PRECAUTIONS PRATIQUES

L'étude technique des deux méthodes nous a montré combien étaient nombreux les facteurs pouvant intervenir dans les phénomènes de l'Electrophorèse et comment ces phénomènes eux-mêmes pouvaient s'influencer les uns sur les autres en combinant ainsi leurs effets.

Donc quelques précautions sont indispensables :

- 1) La température de la pièce où se trouvent les appareils doit être stable.
- 2) On doit réaliser une tension maximum sur le support électrophorétique.
- 3) Le dépôt de la substance antigénique doit être fait d'une manière homogène et régulière.
- 4) Le niveau de la solution tampon doit être le même dans les deux bacs afin d'éviter le phénomène de siphonage.
- 5) Il est prudent, afin de conserver les électrodes en bon état le plus longtemps possible, d'inverser leur polarité à chaque expérience.
- 6) On peut effectuer 5 à 6 opérations électrophorétiques avec le même tampon à condition de mélanger les contenus des deux bacs à la fin de chaque expérience et de conserver le tout à +4°.

C H A P I T R E D E U X I E M E

ETUDE DES RESULTATS OBTENUS

I) OBSERVATIONS ANATOMIQUES DES AORTES

II) APPRECIATION MACROSCOPIQUE DU DEGRE DES LESIONS

III) RESULTATS ANALYTIQUES

- 1) Dosage des protéines totales
- 2) Electrophorèse libre
- 3) Electrophorèse sur papier
- 4) Immuno-électrophorèse.

=====

CHAPITRE DEUXIEME

ETUDE DES RESULTATS OBTENUS

I) OBSERVATIONS ANATOMIQUES DES AORTES

Nous avons étudié en tout 25 cas d'aortes humaines normales et athéroscléreuses.

Il est à noter en premier lieu que les causes de décès de ces malades sont variables et souvent n'ont aucun rapport avec l'athérosclérose. L'appréciation des degrés des dépôts lipidiques, de l'intensité des lésions athéromateuses, de l'abondance des plaques fibreuses et calcaires et surtout l'existence de lésions compliquées nous permettent d'établir une fiche signalétique exacte en degré d'athérosclérose O.M.S.

Nous étudierons dans ce chapitre les types et les lésions responsables du décès selon le sexe et l'âge des individus.

Sur 25 cas étudiés, 15 sont de sexe masculin et 10 de sexe féminin. L'âge des malades décédés s'étale dans une large zone entre 20 et 80 ans.

Les autopsies sont pratiquées de 5 à 22 heures après le décès et les aortes prélevées sont immédiatement lavées, disséquées et préparées pour l'extraction comme nous l'avons indiqué dans le chapitre précédent.

L'ensemble des cas étudiés se trouve résumé dans le tableau I.

Tableau I

Représentation synoptique des cas étudiés

Sexe	Observation N°	Age	Cause du décès
Masculin (15 cas)	1	30	Cancer du pancréas avec oedème du foie
	6	70	Cancer du poumon
	7	52	Accident de la circulation fracture de la colonne vertébrale et fracture du crâne avec des lésions sous jacentes
	10	56	Occlusion intestinale avec perforations multiples
	11	80	Infiltration graisseuse du myocarde, insuffisance coronarienne
	12	34	Silicose avec cancer de l'estomac
	13	66	Infarctus du myocarde
	14	49	Pancréatite hémorragique
	15	74	Bronchopneumonie avec cirrhose du foie
	18	58	Insuffisance coronarienne
	20	45	Leucémie
	21	42	Hypertrophie cardiaque
	22	26	Délirium Tremens
	23	60	Embolie pulmonaire--insuffisance coronarienne
	25	40	Artérite
Féminin (10 cas)	2	70	Thrombose cérébrale suite d'un angiome
	3	60	Méningite tuberculeuse avec tuberculose pulmonaire évolutive
	4	77	Coronarite avec infiltration graisseuse du myocarde
	5	47	Péricardite purulente
	8	72	Insuffisance coronarienne, et péritonite avec pneumonie double
	9	71	Appendicite gangréneuse
	16	47	Embolie pulmonaire gazeuse suite d'un avortement provoqué
	17	38	Hypertrophie cardiaque
	19	75	Aortite syphilitique
	24	25	Insuffisance rénale terminale

Parmi les 25 cas de cette population hétérogène :

6 malades étaient âgés de 20 à 40 ans soit 16%

19 " " " " 40 à 80 ans soit 84%.

II) APPRECIATION MACROSCOPIQUE DU DEGRE DES LESIONS

Toutes les aortes prélevées après autopsie sont disséquées le jour même. Un examen macroscopique nous permet de classer, quelle que soit la cause du décès, ces aortes dans différentes catégories : Normal , subnormal, athéroscléreux et très athéroscléreux.

Afin de standardiser nos études, nous avons adopté le système d'appréciation d' O.M.S. par des degrés d'athérosclérose O, I, II, III (63).

Pour chacune des aortes, nous avons noté sur une fiche signalétique la présence ou l'absence des éléments suivants :

Trainées ou taches lipidiques
plaques fibreuses
Athéromes
Lésions compliquées.

Suivant l'importance de la présence de ces éléments, nous avons pu classer les 25 cas étudiés dans les 4 degrés d'athérosclérose O.M.S. de la manière suivante :

2 cas	:	Degré d'athérosclérose OMS	O
8 "	:	" " "	I
11 "	:	" " "	II
4 "	:	" " "	III

Nous avons considéré que les cas classés dans les degrés d'athérosclérose

OMS 0 et I étaient des cas normaux, les autres des cas pathologiques.

Sur chacune des aortes, nous avons essayé d'évaluer d'une manière approximative les pourcentages de surface intéressée qui englobe respectivement :

la surface des trainées et taches lipidiques
la surface des plaques fibreuses
les surface des athéromes
et la surface totale des lésions compliquées.

Le Tableau II donne les pourcentages des surfaces intéressées de chaque aorte.

Tableau II

Pourcentage des surfaces intéressées par les lésions .

N° d'observation	Degré d'athérosclérose OMS	Pourcentage de la surface totale intéressée.	Pourcentage de la surface intéressée constituée par :			
			Trainées lipidiques	Plaques fibreuses	athérome	Lésions compliquées
I	II	80	10	60	10	0
2	II	79	55	20	2	2
3	II	76	7	62	2	2
4	II	82	10	70	1	1
5	I	75	70	5	0	0
6	II	81	5	75	1	0
7	O	96	95	1	0	0
8	I	70	40	30	0	0
9	II	65	25	40	0	0
10	I	85	80	5	0	0
11	III	52	20	20	7	5
12	O	64	60	4	0	0
13	III	85	25	40	20	0

Tableau II (suite)

N° d'observation	Degré d'athérosclérose OMS	Pourcentage de la surface totale intéressée.	Pourcentage de la surface intéressée par :			
			Trainées lipidiques	Plaques fibreuses	athérome	Lésions compliquées
14	I	63	60	3	0	0
15	I	77	70	7	0	0
16	II	72	60	10	2	0
17	II	55	30	20	5	0
18	II	58	40	15	3	0
19	III	46	20	20	5	1
20	II	51	25	20	6	0
21	II	74	50	20	4	0
22	I	66	60	6	0	0
23	III	44	10	20	10	4
24	I	51	40	10	1	0
25	I	55	35	20	0	0

Quel que soit le degré d'athérosclérose des aortes étudiées, nous avons prélevé pour chacun de ces 25 cas les différents fragments normaux et pathologiques en différents points de la pièce anatomique. Comme il a été indiqué dans le chapitre de l'extraction des protéines solubles, ces différents fragments de 3 cm sur 3 cm environ sont lavés successivement dans plusieurs bains de sérum physiologique et d'eau distillée. Pour s'assurer qu'il n'y avait plus de traces de protéines sériques, nous avons effectué un contrôle par des réactions du Biuret et des réactions de diffusions sur plaques par la méthode d'OUCHTERLONY avec antisérum humain total.

La négativité de la réaction du Biuret avec le réactif de GORNALL et l'absence de traits de précipitation en vingt quatre heures sur le dernier bain grâce à la méthode de diffusion d'OUCHTERLONY nous garantit l'absence totale de protéines sériques.

On procède ensuite à un broyage de ces fragments de tissu dans la solution de Chlorure de Sodium à 9% à raison de 1 ml de sérum physiologique par gramme de tissu frais. On laisse en contact le tissu broyé et le Chlorure de Sodium à 9% pendant vingt quatre heures à +4° pour parfaire l'extraction. Puis une centrifugation à 18.000 tours/minute dans une centrifugeuse réfrigérée nous permet de séparer un surnageant plus ou moins limpide contenant les protéines solubles à analyser.

Vu le nombre de cas étudiés il ne nous est pas possible de donner pour chacun d'eux un extrait complet de la fiche clinique. Nous présenterons cependant à titre d'exemple la fiche correspondant à un cas pour chaque degré O.M.S.

CAS N°1 (fig.10)

Observation N° 7

Degré d'athérosclérose O.M.S. : 0

Malade TOL., sexe masculin, âgé de 52 ans, hospitalisé dans un état comateux par suite d'un accident de la circulation ; décédé le jour-même de son hospitalisation ; l'autopsie a été pratiquée huit heures après le décès. On constate une fracture de la colonne vertébrale et des fractures du crâne avec lésions sous jacentes.

Après dissection de l'aorte, on peut constater la présence de trainées lipidiques et quelques très rares plaques fibreuses.

Le pourcentage de la surface intéressée est de 96% ; elle est constituée par 95% de trainées lipidiques

1% de plaques fibreuses.

CAS N° 2 (figure 11)

Observation N° 10

Degré d'athérosclérose O.M.S. : I

Malaplace LAPL..., sexe masculin, 56 ans, hospitalisé d'urgence dans un service de chirurgie.

Cause du décès : occlusion intestinale avec perforations multiples.

Le pourcentage de la surface intéressée est constitué par
 80% de trainées et de plaques lipidiques
 5% de plaques fibreuses.

CAS N° 3 (figure 12)

Observation N° 2

Degré d'athérosclérose O.M.S. : II

Malade Wie... sexe féminin, âgée de 70 ans, ancienne diabétique connue.

L'autopsie est pratiquée douze heures après le décès ; on constate une thrombose cérébrale suite d'un angiome.

La dissection révèle la présence de très nombreuses trainées lipidiques avec formation de plaques lipidiques assez nettes, de plaques fibreuses de grandes dimensions , et de quelques plaques d'athérome avec environ 2% de lésions compliquées.

CAS N° 4 (figure 13)

Observation N° 13

Degré d'athérosclérose O.M.S. : III

Malade Xav... Sexe masculin, âgé de 66 ans.

Cause du décès : infarctus du myocarde.

L'autopsie est pratiquée 10 heures après le décès.

L'aorte disséquée montre :

25% de trainées lipidiques
 40% de plaques fibreuses
 20% de plaques d'athérome
 et 10% de lésions compliquées.

évaluation des lésions aortiques (aorte thoracique et abdominale)

OBSERVATION N° 7

Date : 22/10/63

Malade : TOL. . .

Age : 52 ans

Cause du décès : Accident de voiture. Fractures de la colonne vertébrale, du crâne avec lésions sous jacentes.

Autopsie : 8 heures après le décès



Taches ou trainées lipidiques



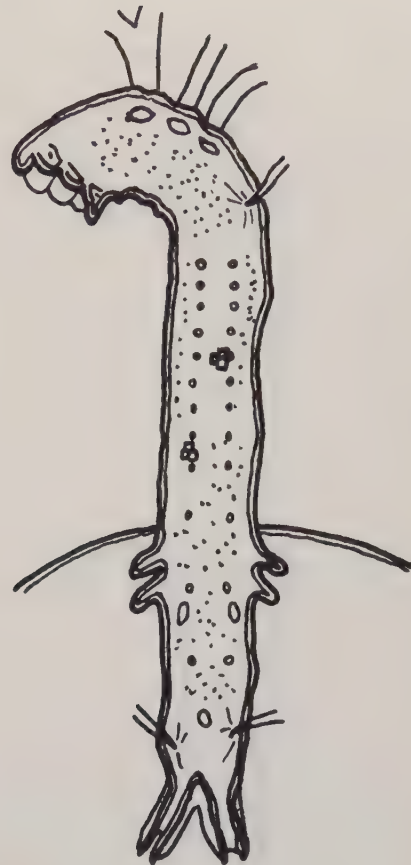
Plaques fibreuses



Athérome



Lésions compliquées



Observation Athérosclérose O.M.S. 0

Pourcentage de la surface totale intéressée	Pourcentage de la surface intéressée constituée par			
	trainées lipidiques	plaques fibreuses	athérome	lésions compliquées
96	95	1	0	0

évaluation des lésions aortiques (aorte thoracique et abdominale)

OBSERVATION N° 10

Date : 26/10/63

Malade : LAPL. . .

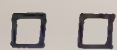
Age : 56 ans

Cause du décès : Occlusion intestinale
Perforations multiples

Autopsie : 5 heures après le décès



Taches ou trainées lipidiques



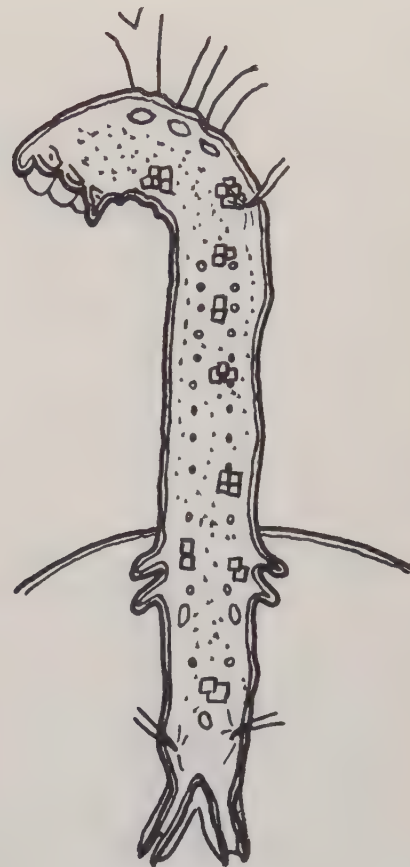
Plaques fibreuses



Athérome



Lésions compliquées



Observation Athérosclérose O.M.S. I

Pourcentage de la surface totale intéressée	Pourcentage de la surface intéressée constituée par			
	trainées lipidiques	plaques fibreuses	athérome	lésions compliquées
85	80	5	0	0

évaluation des lésions aortiques (aorte thoracique et abdominale)

OBSERVATION N° 2

Date : 16/10/63

Malade : WIE. . .

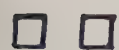
Age : 70 ans

Cause du décès : Hémoptisie. Thrombose.

Autopsie : 12 heures après le décès



Taches ou trainées lipidiques



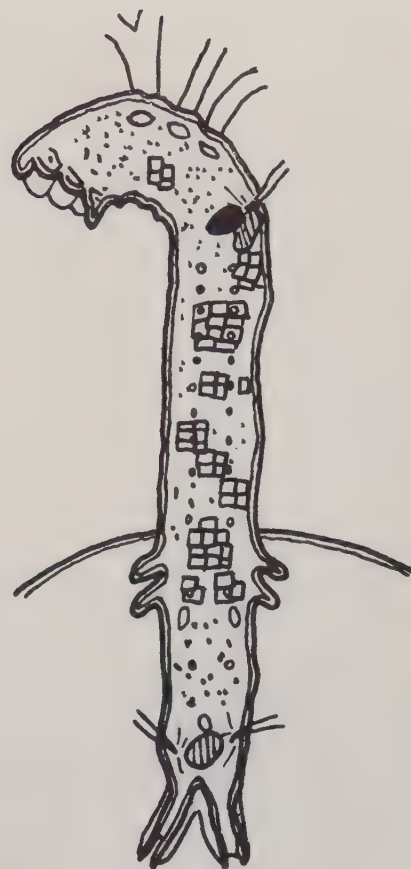
Plaques fibreuses



Athérôme



Lésions compliquées



Observation Athérosclérose O.M.S. II

Pourcentage de la surface totale intéressée	Pourcentage de la surface intéressée constituée par			
	trainées lipidiques	plaques fibreuses	athérôme	lésions compliquées
80	55	21	2	2

évaluation des lésions aortiques (aorte thoracique et abdominale)

OBSERVATION N° 13

Date : 2/2/64

Malade : KAV. . .

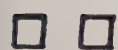
Age : 66 ans

Cause du Décès : Infarctus du myocarde

Autopsie : 10 heures après le décès



Taches ou trainées lipidiques



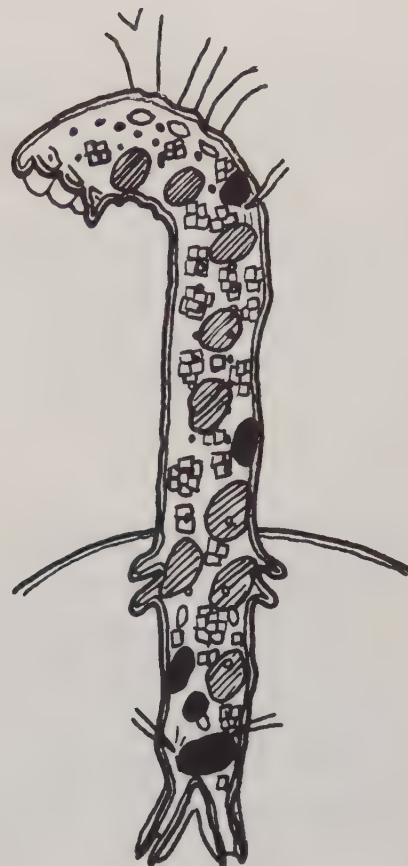
Plaques fibreuses



Athérôme



Lésions compliquées



Observation Athérosclérose O.M.S. III

Pourcentage
de la surface
totale
intéressée

Pourcentage de la surface intéressée constituée par

trainées
lipidiques

plaques
fibreuses

athérôme

lésions
compliquées

95

25

40

20

10

III) RESULTATS ANALYTIQUES

1 - Dosage des protéines totales

Nous avons pratiqué le dosage des protéines solubles des tissus aortiques par la méthode du Biuret selon la technique de GORNALL:

En ajoutant, dans des conditions bien déterminées, une solution de Sulfate de cuivre et de la soude à une solution de protéines, on obtient le développement d'une coloration violette. Le dosage colorimétrique permet l'appréciation de la concentration des ions protéiques.

Ces dosages qui ont été effectués sur 17 cas parmi les 25 étudiés montrent que les extraits de tissu aortique contiennent environ 35 ($\pm 3,5$) mg de protéines totales par gramme de tissu frais pour les fragments d'aorte normale ou sub normale (degré d'athérosclérose OMS O et I). Pour les fragments de tissu athéroscléreux (de degré d'athérosclérose O.M.S. II et III), les protéines s'abaissent d'une manière importante et oscillent autour de 27 ($\pm 4,5$) mg par gramme de tissu frais.

Au cours de nos essais, notre attention a été tout particulièrement attirée par la valeur des protides totaux des extraits aortiques dégraissés préalablement par l'éther à froid (éther conservé à -25°C) par rapport aux extraits salins de la même aorte non soumis à l'éther.

Le dégraissage à l'éther entraîne un abaissement notable du taux des protéines totales de l'ordre de 12%.

On pouvait en outre se demander si l'éther même conservé à -25°C ne risquait pas de précipiter certaines des protéines solubles,

Nous verrons que l'examen immuno-électrophorétique a confirmé cette hypothèse.

Les résultats des dosages sont donnés dans le Tableau III.

Tableau III

Comparaison du taux des Protéines totales de l'extrait aortique traité ou non traité par l'éther

Observation N °	Degré d'athérosclérose O M S	Extrait salin traité par l'éther	Extrait salin non traité par l'éther
I	II	31	36,4
2	II	26	29,2
3	II	23	27
4	II	31	31,5
5	I	32	34
6	II	29	31,5
7	O	34	38
8	I	34	38,5
9	II	29,5	31,5
10	I	32	38,5
11	III	24,5	28
12	O	34,5	38,2
13	III	23,5	27
19	III	26,5	29
23	III	27	31,5
24	I	31,5	33,5
25	I	33	37,5

2 - ELECTROPHORESE LIBRE

L'étude des protéines solubles extraites par le chlorure de sodium à 9%, par la méthode d'électrophorèse libre ou en veine liquide, a été réalisée dans notre laboratoire par FREY (22).

Dans cette méthode, les extraits salins du tissu aortique sont dialysés au préalable pendant 48 heures contre le tampon d'électrophorèse.

La solution conductrice est de pH 8,6 force ionique 0,1.

L'appareil utilisé est de type "TISELIUS" (*).

La durée de la séparation électrophorétique est d'une heure et demie.

Un appareil optique du type "SCANNING" donne un cliché photographique sur lequel chaque fraction protéique est représentée par un pic.

Les mobilités représentent la vitesse des particules protéiques dans un champ électrique en un temps donné. Les moyennes des résultats des dosages effectués par électrophorèse libre sur les tissus normaux et athéroscléreux sont résumées dans le tableau IV.

(*) Constructeur : Perkin Elmer Corporation Glenbrook Norwalk Connecticut U. S. A.

Distributeur : Equipements Industriels 1 rue Monticelli Paris XIV^e

Tableau IV

Moyenne des résultats donnés par l'électrophorèse libre de la fraction extraite par la solution de chlorure de sodium à 9%, d'après FREY (22)

Fragments normaux		Fragments athéroscléreux	
Mobilités $\times 10^{-5} \text{ cm}^2$ $\text{V}^{-1} \text{ s}^{-1}$	Quantités de protéines mg/g de tissu frais	Mobilités $\times 10^{-5} \text{ cm}^2$ $\text{V}^{-1} \text{ s}^{-1}$	Quantités de protéines mg/g de tissu frais
- 7	11,8	- 7,2	9,3
- 6	3,7	- 6,1	4,1
- 5,2	3,7	- 5,1	4,3
- 3,9	7 ⁺ 3,2	- 3,7	5,7 ⁺ 2,4
- 1,5	5	- 2,4	5,1

Par cette méthode analytique FREY a pu mettre en évidence 5 fractions correspondant à 5 pics de mobilités variables, mais il n'a pas trouvé de différence nette pour chaque fraction séparée entre les fragments normaux et athéroscléreux.

3 - Electrophorèse sur papier

Les extraits salins des protéines solubles du tissu aortique destinés à être étudiés par cette technique, sont concentrés au préalable contre une solution de subrosan pendant quarante huit heures à +4°C. Le produit de dialyse est centrifugé pendant 10 minutes à 5000 tours par minute. On obtient ainsi un taux de protéines totales aux environs de 15 à 20 grammes pour mille.

Pour les protéinogrammes, la quantité de substrat protéique utilisée est de 60 microlitres environ. Le dépôt du mélange protéique se fait en trois fois avec la méthode à sec comme nous l'avons indiqué précédemment. Il est nécessaire de laisser sécher le dépôt entre deux "charges" de substance à étudier afin d'éviter un étalement exagéré de la tache sur la feuille de papier.

Le tampon véronal est de pH 8,4 et de force ionique 0,1.

L'électrophorèse se déroule normalement à la température du laboratoire pendant 10 à 12 heures sous une tension de 110 volts et sous une intensité de deux milliampères.

Toutes les autres opérations (séchage, coloration, décoloration, mesure des pourcentages) ont été effectuées selon la technique précédemment décrite.

L'électrophorèse sur papier des extraits de protéines solubles de l'aorte nous permet de distinguer cinq groupes de fractions protéiques qui ont des mobilités identiques à celles des albumines, α_1 globulines, α_2 globulines, bêta globulines et gamma globulines.

Il est à noter que les α_1 et α_2 globulines sont souvent réunies. Nous indiquons dans le tableau V les résultats en pourcentage des différentes

fractions protéiques contenues dans les extraits salins des tissus aortiques sains et athéroscléreux, et dans le tableau VI les résultats correspondant en milligrammes par gramme de tissu frais.

Tableau V

Pourcentage des fractions protéiques des extraits aortiques normaux et athéroscléreux

Observation N°	Degré d'athérosclé- rose O.M.S.	Albumines %	Alpha ₁ et Alpha ₂ globulines %	bêta globulines %	gamma globulines %
1	II	33	8	35	24
2	II	29,5	9,5	34,5	26,5
3	II	32	8,5	33,5	26
4	II	33,5	8	32	26,5
5	I	37	9,25	23	30,75
6	II	33,5	8,5	31,25	26,75
7	O	36,5	9	24	30,5
8	I	37,5	9,75	22,5	30,25
9	II	35	8	31	26
10	I	35,5	10,5	20,5	33,5
11	III	29,5	7,5	27	36
12	O	36	9,5	23	31,5
13	III	31,5	9,5	35	24
14	I	36,75	9,25	20,25	33,75
15	I	37	8,5	22	32,5

Tableau V

Pourcentage des fractions protéiques des extraits aortiques normaux et
athéroscléreux
(suite)

Observation N°	Degré d'athérosclé- rose O.M.S.	Albumines %	Alpha ₁ et Alpha ₂ globulines %	bêta globulines %	gamma globulines %
16	II	31	9	35	25
17	II	33	8	33	25
18	II	32,5	9,5	31	27
19	III	32,75	8,25	32	27
20	II	32,5	8,5	34	25
21	II	33	8	32	27
22	I	32	8,5	33	26,5
23	III	28,5	8	27	36,5
24	I	34	10	26	30
25	I	36	8	25,5	30,5

Tableau VI

Appréciation quantitative des fractions protéiques des extraits aortiques normaux
et athéroscléreux

Observation N°	Degré d'athé- rosclérose OMS	Protéines totales mg/g	Albumine mg/g	Globulines mg/g		
				Alpha ₁ et Alpha ₂	bêta	gamma
1	II	36,4	12	2,9	12,7	8,8
2	II	29,2	8,5	3	10,1	7,6
3	II	27	8,6	2,3	9	7
4	II	31,5	10,5	2,5	10,2	8,3
5	I	34	12,6	3,15	7,85	10,4
6	II	31,5	10,6	2,7	9,8	8,4
7	O	38	13,8	3,4	9,2	11,6
8	I	38,5	14,4	3,7	8,7	11,7
9	II	31,5	11	2,5	9,8	8,2
10	I	38,5	13,7	4	7,9	12,9
11	III	28	8,3	2,1	7,6	10
12	O	38,2	13,8	3,6	8,8	12
13	III	27	8,5	2,5	9,5	6,5
14	I	34,5	12,6	3,2	7,1	11,6
15	I	36,4	13,5	3,1	8	10,8
16	II	35	10,9	3,2	12,2	8,7
17	II	36,2	12	3	12	9,2
18	II	28,5	9,3	2,7	8,8	7,7
19	III	29	9,5	2,4	9,3	7,8
20	II	31	10,1	2,65	10,5	7;75
21	II	32,5	10,7	2,6	10,4	8,8
22	I	38,5	12,3	3,3	12,7	10,2
23	III	31,5	9	2,5	8,5	11,5
24	I	33,5	11,4	3,3	8,7	10,1
25	I	37,5	13,4	3	9,6	11,5

Parallèlement, à chaque expérience, nous avons fait migrer un sérum humain normal dans le but de pouvoir identifier avec précision les positions des différents spots protéiques.

D'autre part, nous avons réalisé le fractionnement par l'électrophorèse sur papier des lipoprotéines de ces extraits salins concentrés.

Le dépôt s'effectue à sec et la quantité de protéines solubles nécessaire est double de celle utilisée pour un protéinogramme.

Comme pour les opérations précédentes, nous avons fait migrer toujours à chaque expérience un lipidogramme du sérum humain normal.

La coloration se fait par la solution de NOIR Soudan dans l'alcool à 60°.

Comme dans le sérum sanguin, les extraits des tissus aortiques par le chlorure de Sodium à 9%, concentrés donnent deux fractions analogues à des alpha et bêta lipoprotéines sériques.

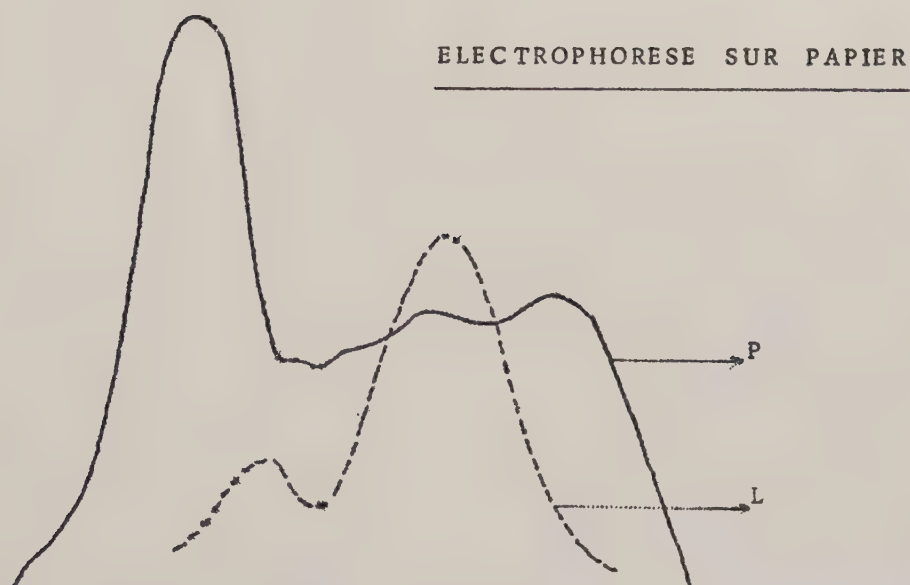
Les résultats des lipidogrammes nous ont permis d'établir le tableau VII

Nous donnons également à titre d'exemples les tracés des protéinogrammes et lipidogrammes obtenus pour chaque degré O.M.S. d'athérosclérose (figures 14- 15- 16- 17).

Tableau VII

Observations N°	Degré d'athérosclé- rose O. M. S.	Alpha lipoprotéines %	Bêta lipoprotéines %
1	II	15	85
2	II	13,5	86,5
3	II	11	89
4	II	13	87
5	I	17	83
6	II	15	85
7	O	19,5	80,5
8	I	19	81
9	II	13	87
10	I	16,5	83,5
11	III	13	87
12	O	21,5	78,5
13	III	12	88
14	I	18,5	81,5
15	I	19	81
16	II	14,5	85,5
17	II	14	86
18	II	13,5	86,5
19	III	11	89
20	II	15	85
21	II	15	85
22	I	20,5	79,5
23	III	12	88
24	I	19,5	80,5
25	I	19,5	80,5

Figure 14

Cas N° 1.

Observation N° 7

Degré d'athérosclérose OMS 0

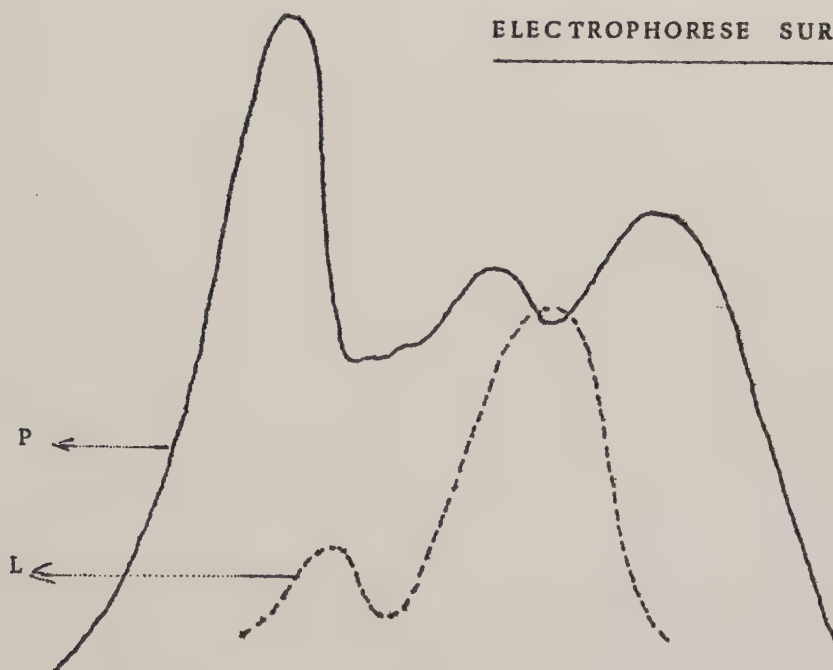
PROTEINOGRAMME :

Albumines.....	36,5%
Alpha I et II Globulines	9
Bêta globulines	24
Gamma globulines	30,5
	100%

LIPIDOGRAMME :

Alpha lipoprotéines	19,5%
Bêta lipoprotéines	80,5%
	100%

Figure 15

ELECTROPHORESE SUR PAPIERCas N° 2

Observation N° 10

Degré d'athérosclérose OMS I

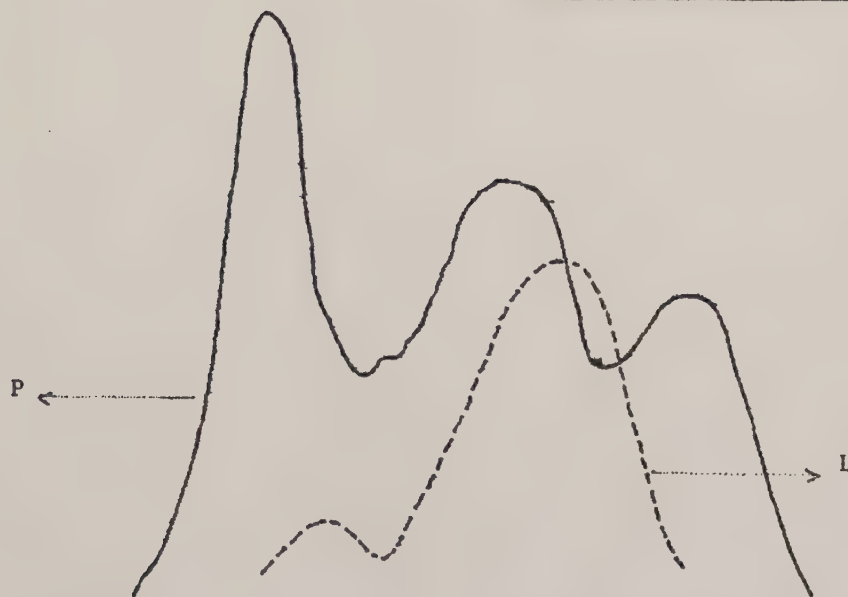
PROTEINOGRAMME

Albumines	35,5%
Alpha I et II globulines	10,5
Bêta globulines	20,5
Gamma globulines	33,5
	100%

LIPIDOGRAMME

Alpha lipoprotéines	16,5
Bêta lipoprotéines	83,5
	100%

Figure 16

ELECTROPHORESE SUR PAPIERCas N° 3

Observation N° 2

Degré d'athérosclérose OMS II

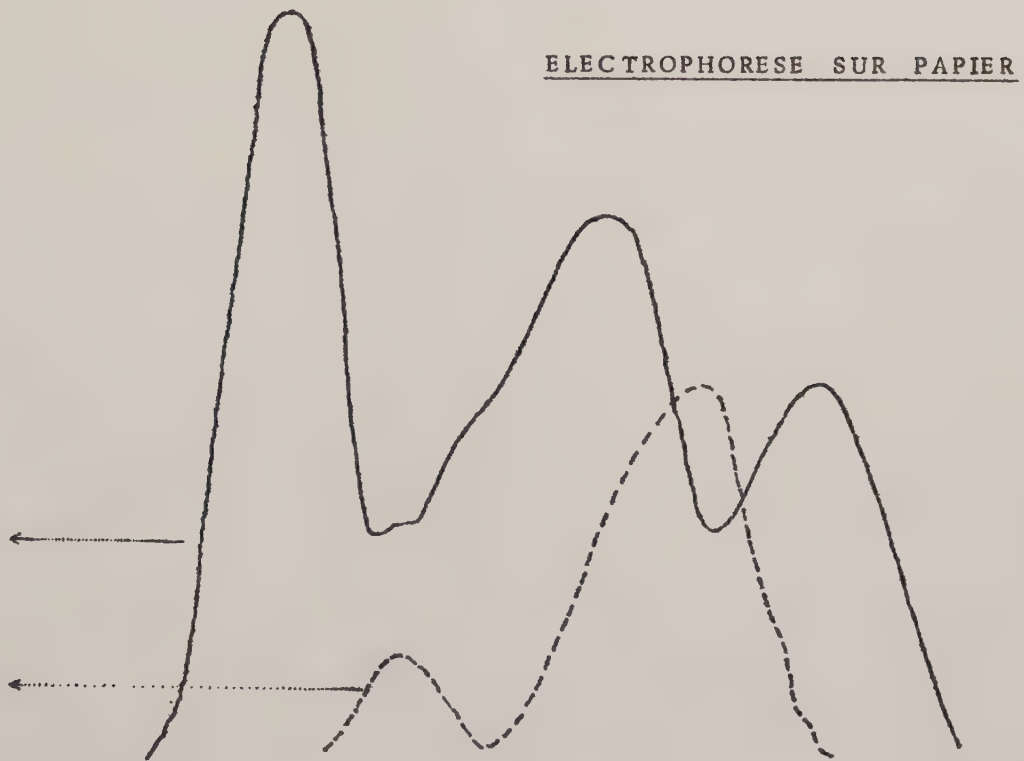
PROTEINOGRAMME

Albumines	29,5%
Alpha I et II globulines	9,5
Bêta globulines	34,5
Gamma globulines	26,5
	100 %

LIPIDOGRAMME

Alpha lipoprotéines	13,5%
Bêta lipoprotéines	86,5
	100 %

Figure 17

Cas N° 4

Observation N° 13

Degré d'athérosclérose OMS III

PROTEINOGRAMME

Albumines	31,5%
Alpha I et II globulines	9,5
Bêta globulines	35
Gamma globulines	24
	100%

LIPIDOGRAMME

Alpha lipoprotéines	12 %
Bêta lipoprotéines	88 %
	100 %



DISCUSSION

a) Protéinogrammes :

L'étude des résultats moyens obtenus (Tableau VIII) sur le sérum humain normal et sur les extraits aortiques normaux et athéroscléreux, montre que :

- Il existe dans les extraits aortiques pris dans leur ensemble, par rapport au sérum humain, des variations portant d'une part sur les albumines qui sont diminuées et d'autre part sur les globulines bêta et gamma qui sont augmentées. Les alpha globulines restent inchangées.

- Si l'on compare les extraits aortiques normaux aux extraits aortiques athéroscléreux on s'aperçoit que, dans les fragments athéroscléreux :

- l'albumine est diminuée ($P < 0,0005$)

- les globulines α_1 et α_2 sont légèrement diminuées ($0,010 < P < 0,0125$)

- les globulines bêta sont nettement augmentées ($P < 0,0005$)

- les globulines gamma sont diminuées ($P < 0,0005$)

- La comparaison des résultats obtenus grâce à l'électrophorèse libre (Tableau IV) et l'électrophorèse sur papier (Tableau VI) montre des variations portant sur les alpha globulines plus élevées dans la première méthode, et sur les gamma globulines plus élevées dans la seconde. Les variations sont en accord avec les résultats trouvés par les différents auteurs qui ont utilisé ces deux techniques.

Tableau VIII

Pourcentages et écart type des fractions protéiques du sérum humain normal et des extraits aortiques normaux et athéroscléreux.

Examen		Protéinogramme					Lipidogramme	
Fractions		Albumine	Globulines				Globulines	
Nature		A	Alpha ₁	Alpha ₂	bêta	gamma	Alpha	bêta
Sérum humain normal		58,60	3,40	8,00	12,50	17,50	25,00	75,00
Tissu aortique normal (nombre de cas: 10)	Pourcentages	35,83	9,24		23,98	30,95	19,05	80,95
	Ecart type	±0,52	±0,24		±1,10	±0,65	±0,46	±0,46
Tissu aortique athéroscléreux (nombre de cas: 15)	Pourcentages	32,06	8,46		32,24	27,24	13,37	86,63
	Ecart type	±0,45	±0,17		±0,66	±0,95	±0,36	±0,36

b) Les lipidogrammes

La comparaison des résultats des divers lipidogrammes réalisés (Tableau VIII) permet de mettre en évidence :

- une augmentation des bêta lipoprotéines des extraits aortiques aussi bien normaux qu'athéroscléreux par rapport aux valeurs trouvées pour le sérum sanguin. Cette augmentation est plus nette dans les fragments athéroscléreux.
- une diminution des alpha lipoprotéines également plus marquée dans les fragments athéroscléreux que dans les fragments normaux.

L'ensemble des résultats précédents permet d'émettre un certain nombre d'hypothèses.

On peut admettre tout d'abord qu'il s'effectue un phénomène de filtration des protéines sériques à travers la paroi aortique et que ce mécanisme est réversible.

Cependant ce phénomène est beaucoup trop important pour expliquer à lui seul les variations observées.

On peut supposer qu'aux processus de filtration à travers la paroi viennent se surajouter des phénomènes métaboliques entraînant une biosynthèse ou un catabolisme sélectif de telle ou telle fraction protéique. Ces phénomènes métaboliques pourraient même remplacer complètement les phénomènes de filtration.

On doit également remarquer que les variations les plus importantes portent essentiellement sur les bêta et gamma globulines. Des hypothèses variées sur le rôle de ces molécules dans le métabolisme de la paroi aortique

normale et athéroscléreuse ont été émises.

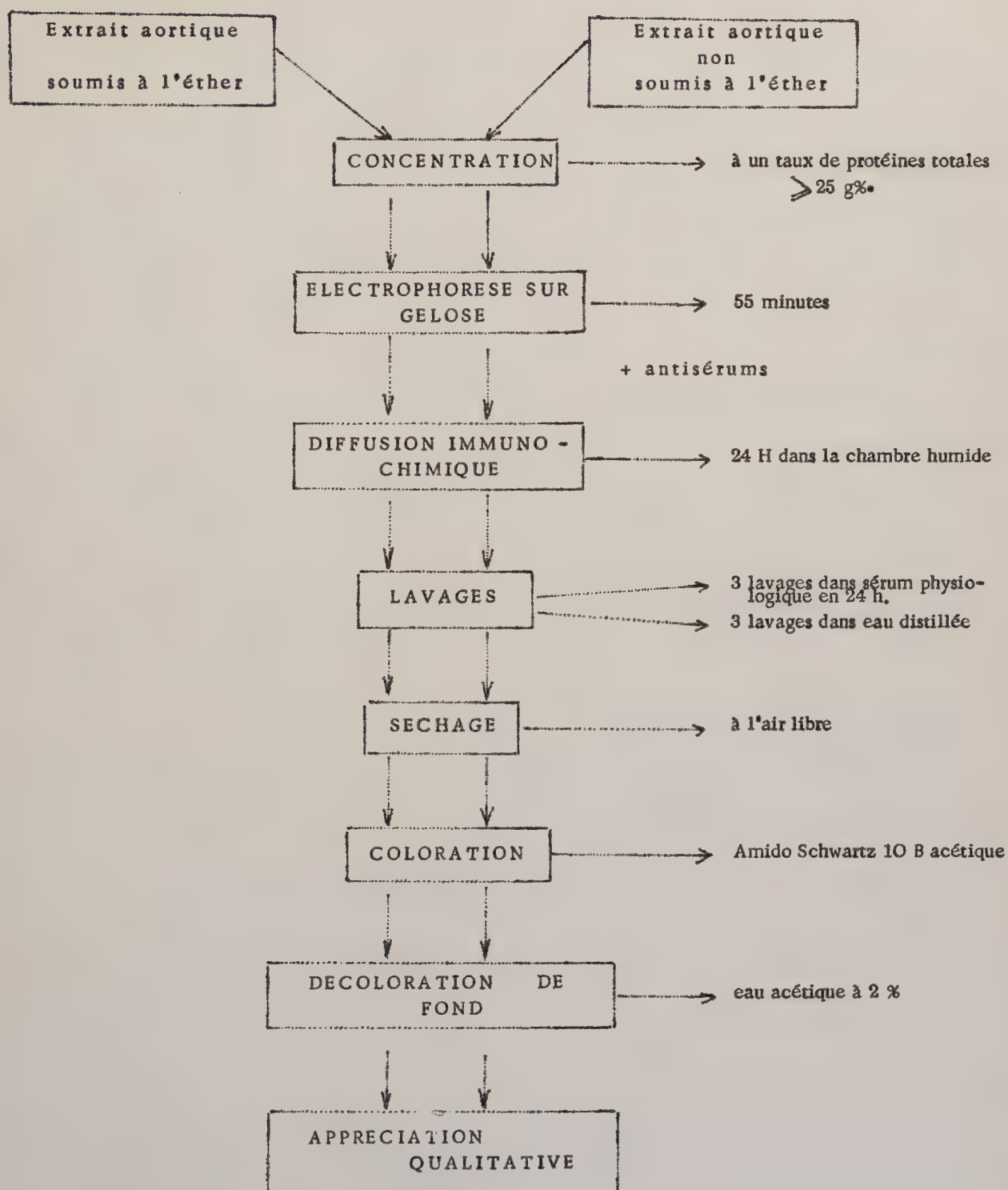
A eux seuls nos résultats ne nous permettent pas de prendre position à cet égard.

4 - Immuno-Electrophorèse

L'électrophorèse en veine liquide ou l'électrophorèse sur papier ne nous permettent pas d'identifier avec une certitude absolue chacune des fractions précédentes ; seule la technique immuno-chimique à l'aide des antisérums totaux et spécifiques nous conduit à une identification précise et directe de ces différentes protéines solubles.

N'ayant pu concentrer les extraits aortiques de façon à obtenir un taux de protéines totales égal à celui du sérum humain normal, nous nous sommes contentés d'effectuer une concentration telle qu'il se trouve au minimum 25 grammes de protéines par litre dans le milieu destiné à l'analyse immuno-électrophorétique. Une telle concentration permet d'obtenir en règle générale des arcs de précipitation suffisamment nets pour pouvoir être identifiés.

Sans entrer dans les détails techniques que nous avons décrits dans le chapitre d'immuno-électrophorèse nous essayerons de schématiser cette opération de la manière suivante :



CONCENTRATION

Nous avons préféré la méthode de dialyse contre la polyvinylpyrrolidone (P.V.P.) à la dessiccation sous vide avec le "Silicagel".

Les extraits des protéines solubles sont placés dans un sac cellulosique dont on noue les deux extrémités ; le sac de dialyse est placé dans un b cher et immergé dans une solution de P.V.P. ou mieux encore enrobé de poudre sèche de P.V.P. La dialyse s'effectuera à la température de + 4 . Il n'y a pratiquement aucune perte protéique.

LES ANTISERUMS

a) Antisérum humain total (*): C'est un mélange à partie égale de deux immun-sérums (IS) qui proviennent de chevaux hyperimmunisés pendant plusieurs mois avec un mélange de sérums humains normaux.

. IS du cheval N  223 : il contient peu d'anticorps anti β_2A , mais réagit bien avec les gamma globulines.

. IS du cheval N  306 : Il ne donne pas d'arc de précipitation avec l'albumine, mais réagit bien avec les β_2A et β_2M globulines.

b) Antisérums humains spécifiques (**): Ce sont des immun-sérums obtenus par hyperimmunisation de lapins à l'aide de fractions pures préparées suivant la méthode de GOFMAN par flottation après ultra-centrifugation.

(*) : Institut Pasteur Paris 36 rue du Docteur Roux Paris XV 

(**) : BEHRING WERKE AG MARBURG-LAHN
Distributeur: Biotrol 3 rue de Béarn Paris III 

Nous avons utilisé :

Les antisérums spécifiques: anti Alpha₁ lipoprotéines
 anti Alpha₂ lipoprotéines
 anti bêta lipoprotéines
 anti gamma₁M globulines ou anti bêta₂M
 globulines
 anti gamma₁A globulines ou anti bêta₂A
 globulines

FRACTIONS OBTENUES AVEC L'ANTISERUM TOTAL

Nous avons constaté que l'antisérum total donne sur une même aorte des résultats différents suivant que les extraits sont soumis ou non à l'éther à froid.

Nous présentons dans le Tableau IX les résultats obtenus avec les 25 aortes saines et athéroscléreuses.

- . Avec les extraits non traités par l'éther il apparaît d'une manière constante sept arcs de précipitation en présence d'antisérum total.
- . Avec les extraits étherés, le nombre d'arcs varie de trois à six au maximum.

La figure 18 est un exemple des variations observées.

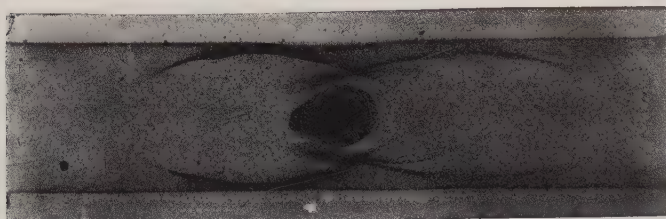
Dans ces conditions nous avons pratiquement abandonné la technique d'extraction par l'éther et nous avons utilisé surtout l'extrait salin total concentré.

Dans cet exposé nous ne citerons les résultats obtenus avec les extraits étherés que pour démontrer les inconvénients présentés par l'utilisation de tels milieux.

Figure 18
—

Comparaison des arcs de précipitation obtenus avec les extraits aortiques
traités et non traités par l'éther.

Traité par éther



Non traité par éther

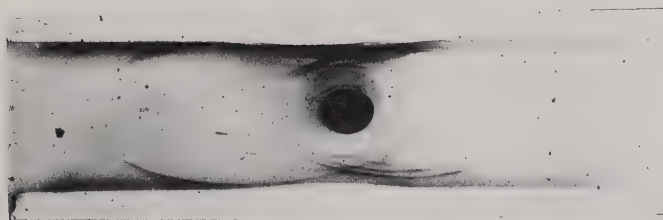


Tableau IX

Comparaison du nombre d'arcs de précipitation obtenus en présence d'antisérum total sur des extraits traités ou non traités par l'éther.

Observation N°	Degré d'athérosclérose O. M. S.	Nombre d'arcs de précipi- tation avec extrait dégrais- sé à l'éther. (antisérum humain total)	Nombre d'arcs de précipi- tation avec extrait salin brut. (antisérum humain total)
1	II	5	7
2	II	6	7
3	II	4	7
4	II	5	7
5	I	4	7
6	II	4	7
7	O	5	7
8	I	5	7
9	II	5	7
10	I	6	7
11	III	5	7
12	O	4	7
13	III	5	7
14	I	5	7
15	I	6	7
16	II	6	7
17	II	5	7
18	II	5	7
19	III	3	7
20	II	4	7
21	II	4	7
22	I	4	7
23	III	3	7
24	I	5	7
25	I	6	7

Les résultats obtenus par action de l'antisérum total sur le sérum sanguin l'extrait aortique normal et l'extrait aortique athéroscléreux sont représentés sur les figures 19 - 20 et 21.

ESSAIS D'IDENTIFICATION DES FRACTIONS PROTEIQUES SUPPOSEES

par l'emploi de méthodes chimiques et de floculation.

a) Les albumines

Dans l'étude des électrophorèses sur papier des protéines solubles de l'aorte, nous avons trouvé, en comparant avec des tracés électrophorétiques du sérum normal humain, des plages correspondant à la vitesse de migration des albumines, des alpha, bêta et gamma globulines.

LOHMAN (46), par immunoélectrophorèse sur gélose a pu identifier une ligne de précipitation caractéristique de l'albumine.

VALDIGUIE (88-89) a retrouvé en injectant de la sérum-albumine marquée par ^{131}I dans les veines d'un chien, l'isotope marqué dans la paroi aortique.

FREY (22) a vérifié la présence de l'albumine dans le tissu aortique en comparant la valeur des groupements NH_2 terminaux libres de la fraction la plus rapide isolée par électrophorèse sur colonne avec celle de l'albumine humaine sérique. La valeur rapportée à un poids moléculaire protéique de 100.000 est 140,5 ; elle est effectivement très proche de celle donnée par TRISTAM pour l'albumine sérique qui est de l'ordre de 142,7;

D'autre part, par une solution de l'acide 2 (4° hydroxy - azobène) benzoïque dans du versénate de sodium à 2%, selon la technique de WRENN et FEICHTMEIR (92) nous avons pu caractériser l'albumine qui donne une coloration avec un maximum d'absorption à la longueur d'onde de 480 m μ .

Figure 19

Immuno-électrophorèse d'un sérum sanguin normal

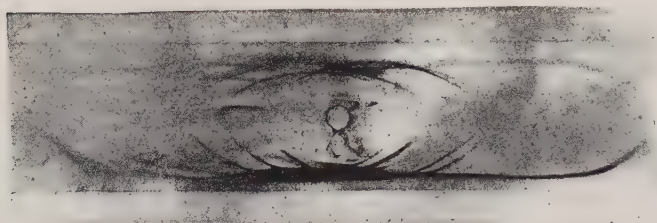


Figure 20

Immuno-électrophorèse d'un extrait aortique normal

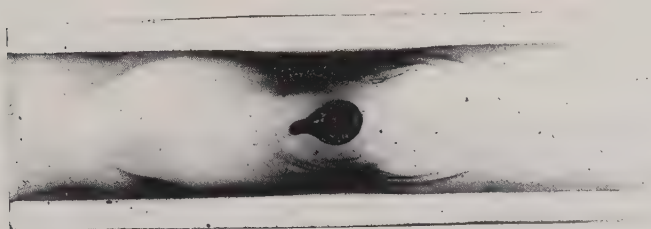
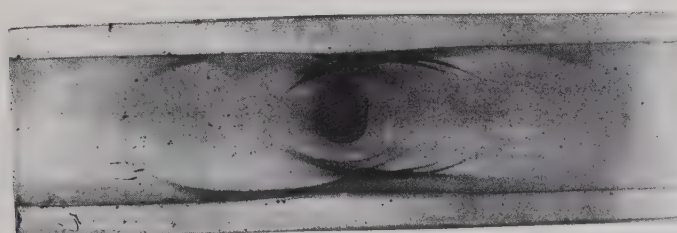


Figure 21

Immuno-électrophorèse d'un extrait aortique athéroscléreux



b) Les Lipoprotéines

Sur les tracés des lipidogrammes des protéines solubles aortiques nous avons pu constater sur les 25 extraits salins non soumis à l'éther la présence constante des alpha et bêta lipoprotéines.

Si les alpha lipoprotéines n'ont que peu retenu l'attention des chercheurs du fait de leur stabilité, par contre les bêta lipoprotéines ont fait l'objet de nombreux travaux.

GERO et Coll. (23) ont montré par la méthode immuno-électrophorétique la présence des bêta lipoprotéines dans l'intima de l'aorte humaine.

Il est bien connu que cette fraction, renfermant en majorité des lipides totaux et en particulier du cholestérol, est souvent en relation étroite avec des états pathologiques actuellement très répandus: athérosclérose, diabète, etc...

Afin d'identifier ces fractions lipoprotéiques, nous avons utilisé des tests de floculations et des antisérums spécifiques.

- Test de KUNKEL Phénol

La réaction phénolique de KUNKEL, mise au point en 1945 par KUNKEL fut décrite par l'auteur comme un moyen simple et facile de doser les lipides totaux.

Depuis il a été prouvé par de nombreux auteurs que ce test permet d'évaluer le taux des lipoprotéines à grosse molécule, c'est-à-dire les alpha et bêta lipoprotéines.

Il y aurait donc un parallélisme étroit entre l'importance des

lésions athéroscléreuses et le test phénolique.

Ce test est positif pour tous les extraits aortiques non soumis à l'éther.

- Test de BURSTEIN au sulfate de dextrane

BURSTEIN avait montré que l'addition à une substance protéique d'héparine ou d'héparinoïde de synthèse (sulfate de dextrane) entraînerait en présence d'une quantité déterminée de chlorure de calcium une précipitation spécifique des bêta lipoprotéines.

Ce test comme le précédent s'avère positif sur les extraits salins non soumis à l'éther.

FRACTIONS OBTENUES AVEC LES ANTISERUMS SPECIFIQUES

La mobilité électrophorétique, la vitesse de migration des fractions, par comparaison avec un sérum normal humain, montraient bien leur présence dans les protéines.

VALDIGUIE (88-89) , en étudiant les protéines du tissu aortique , a montré l'existence indiscutable des α_1 , α_2 , bêta et gamma globulines dans les extraits.

GERO et Coll. (23) ont montré par la méthode immuno-électrophorétique l'existence des bêta et gamma globulines.

LOHMAN (46) , par électrophorèse sur gel d'amidon d'une part et par immuno-électrophorèse d'autre part ont réaffirmé la présence des α_1 , α_2 , bêta et gamma globulines.

Dans le travail que nous avons réalisé, nous avons utilisé les divers

antisérums spécifiques précédemment cités.

En ce qui concerne les antisérums antilipoprotéines, nous avons observé que les sérum anti α_1 et anti bêta donnent des arcs de précipitation caractéristiques avec les extraits non soumis à l'éther alors qu'ils sont sans action avec les extraits traités par l'éther.

L'antisérum anti α_2 lipoprotéines ne nous a jamais donné de réaction positive avec les extraits aortiques traités ou non traités par l'éther.

Pour les deux derniers antisérums (anti γ_1M et anti γ_1A globulines), seul l'antisérum anti γ_1M globulines donne un arc de précipitation spécifique avec les extraits non soumis à l'éther. Il ne donne aucune réaction avec les extraits éthérés. L'arc de précipitation de la γ_1M globuline se trouve déplacé par rapport à sa position normale, mais on sait que l'arc de précipitation de cette globuline n'est pas d'une fixité remarquable.

L'antisérum anti γ_1A ne donne aucun arc de précipitation avec les extraits aortiques éthérés ou non.

Nous présentons dans le Tableau X les résultats obtenus par les immun-sérums spécifiques utilisés.

Les figures (22-23-24) illustrent chacun des degrés d'athérosclérose étudiés pour les exemples choisis.

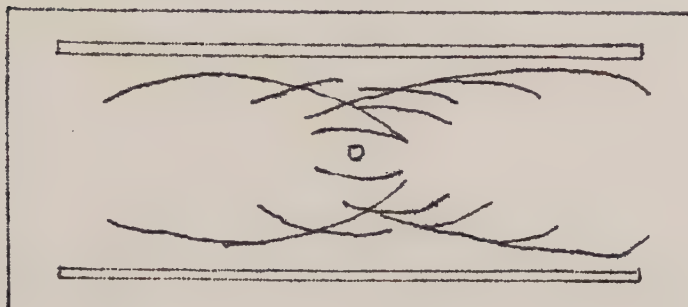
DISCUSSION

L'examen du Tableau X permet de retirer les renseignements suivants :

a) Avec l'antisérum total

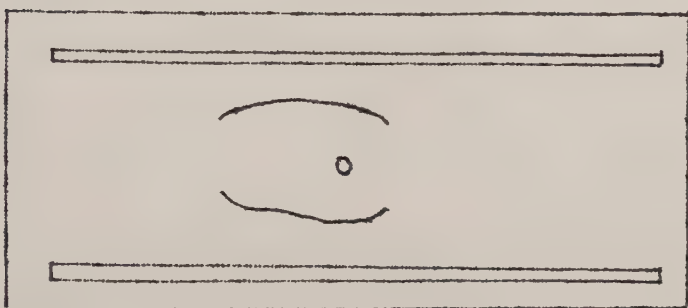
Figure 22

Résultats obtenus : Degré d'athérosclérose O M S O

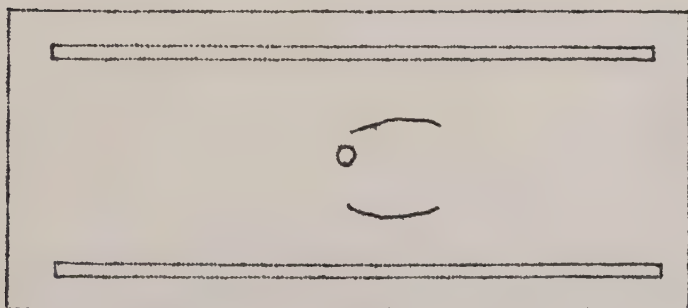


Malade: TOL...

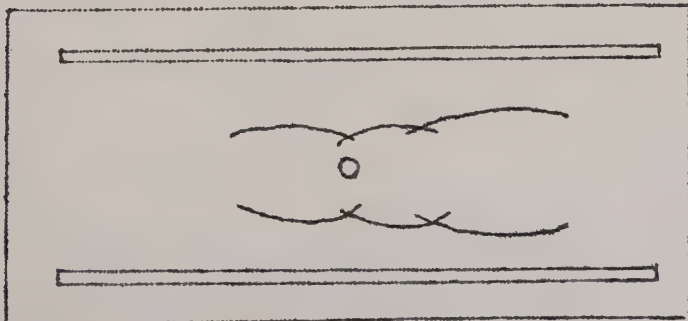
Immun-sérum total



Sérum anti α_1
lipoglobuline



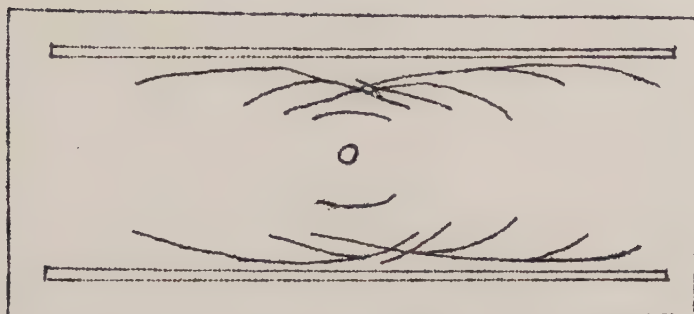
Sérum anti bêta
lipoglobuline



Sérum anti α_1 , bêta
et γ_1 M globulines

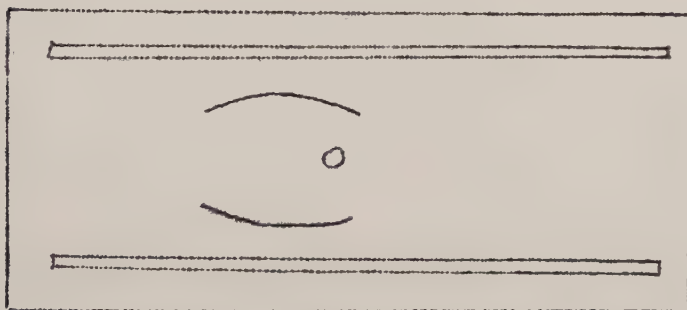
Figure 23

Résultats obtenus : Degré d'athérosclérose O M S I

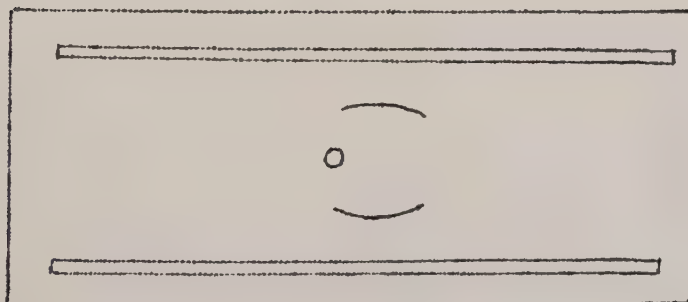


Malade: LAPL.....

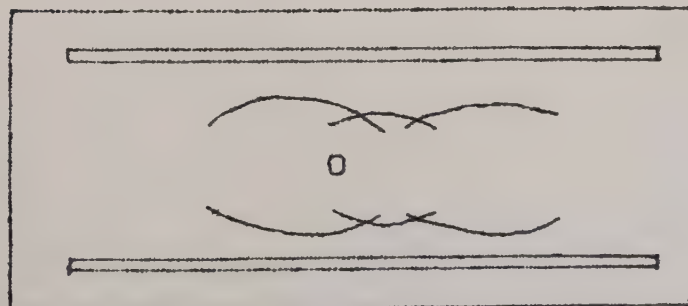
Immun-sérum total



Sérum anti α_I
lipoglobuline



Sérum anti β
lipoglobuline

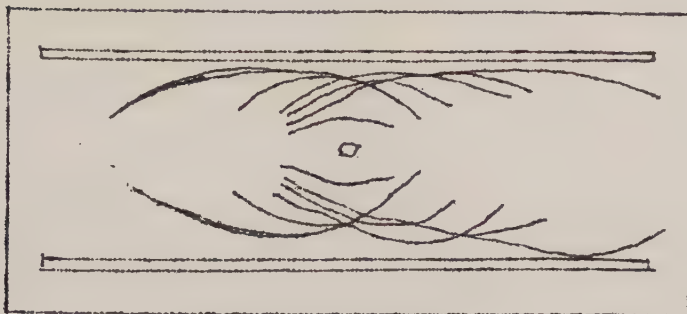


Sérum anti α_I , β
et γ_M globulines

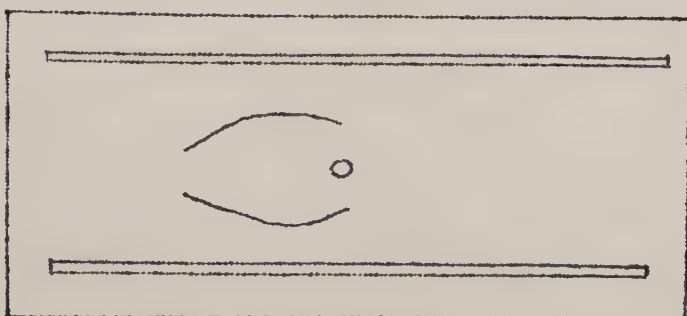
Figure 24

Résultats obtenus : Degré d'athérosclérose O M S II

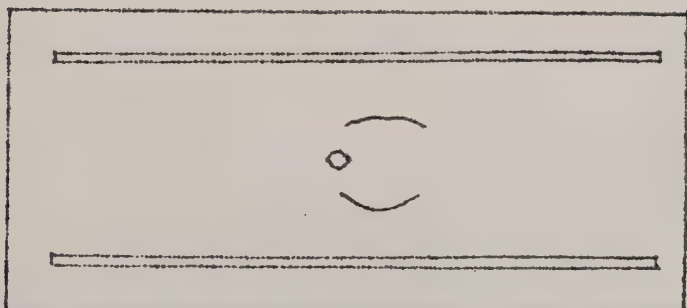
Malade : WIE...



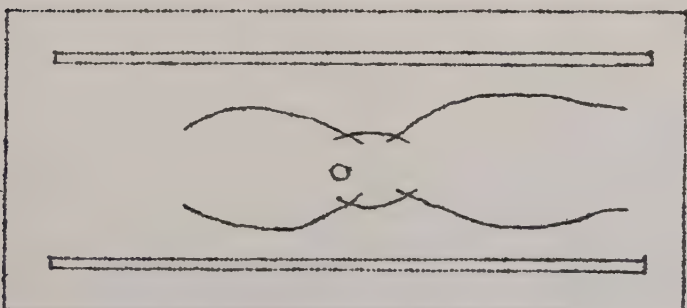
Immun sérum total



Sérum anti α_1
lipoglobuline



Sérum anti Bêta
lipoglobuline



Sérum anti α_1 , bêta
et γ_M globulines

Tableau X

Arcs de précipitation obtenus en présence d'antisérums totaux et spécifiques.

Observation N°	Degré d'athérosclérose O.M.S.	Nombre d'arcs de précipitation											
		Extrait éthéré						Extrait non éthéré					
		ASHT	A1L	A2L	ABL	AG1M	AG1A	ASHT	A1L	A2L	ABL	AG1M	AG1A
1	II	5	O	O	O	O	O	7	I	O	I	I	O
2	II	6	O	O	O	I	O	7	I	O	I	I	O
3	II	4	O	O	O	I	O	7	I	O	I	I	O
4	II	5	O	O	O	I	O	7	I	O	I	I	O
5	I	4	O	O	O	O	O	7	I	O	I	I	O
6	II	4	O	O	O	O	O	7	I	O	I	I	O
7	O	5	O	O	O	O	O	7	I	O	I	I	O
8	I	5	O	O	O	O	O	7	I	O	I	I	O
9	II	5	O	O	O	O	O	7	I	O	I	I	O
10	I	6	O	O	O	O	O	7	I	O	I	I	O
11	III	5	O	O	O	I	O	7	I	O	I	I	O
12	O	4	O	O	O	I	O	7	I	O	I	I	O
13	III	5	O	O	O	I	O	7	I	O	I	I	O
14	I	5	O	O	O	I	O	7	I	O	I	I	O
15	I	6	O	O	O	I	O	7	I	O	I	I	O
16	II	6	O	O	O	I	O	7	I	O	I	I	O
17	II	5	O	O	O	I	O	7	I	O	I	I	O
18	II	5	O	O	O	I	O	7	I	O	I	I	O
19	III	3	O	O	O	I	O	7	I	O	I	I	O
20	II	4	O	O	O	O	O	7	I	O	I	I	O
21	II	4	O	O	O	O	O	7	I	O	I	I	O
22	I	4	O	O	O	I	O	7	I	O	I	I	O
23	III	3	O	O	O	I	O	7	I	O	I	I	O
24	I	5	O	O	O	I	O	7	I	O	I	I	O
25	I	6	O	O	O	I	O	7	I	O	I	I	O

A.S.H.T = antisérum humain total
 A.1.L. = antisérum alpha 1 lipoprotéine
 A.2.L. = antisérum alpha 2 lipoprotéine

A.B.L. = antisérum bêtalipoprotéine
 A.G.1.M. = antisérum gamma 1 macroglobuline
 A.G.1.A. = antisérum gamma 1A globuline

- . 7 arcs de précipitations avec extraits non soumis à l'éther.
- . 3 à 6 arcs seulement avec extraits traités à l'éther même à froid.

b) Avec les antisérums spécifiques

- Présence constante d' α_1 lipoprotéines
de bêta lipoprotéines
de γ_1 M globulines
- Absence d'arc de précipitation des α_2 lipoprotéines.
Nous avons supposé que l'antigène spécifique était dans ce dernier cas soit en quantité trop faible, soit totalement absent.
- Aucun arc de précipitation avec les antisérums spécifiques quand on s'adresse aux extraits traités par l'éther. Nous avons donc supposé que l'éther, même refroidi à -25° a pu enlever les lipoprotéines et une partie des gamma globulines.

Les données précédentes montrent que sur les sept fractions obtenues grâce aux antisérums humains totaux, cinq peuvent être identifiés avec certitude:

- L'albumine grâce à sa réaction positive avec l'acide 2 (4'hydroxyazo-benzène) benzoïque.
- Une α_1 lipoglobuline grâce à l'antisérum spécifique
- Une bêta lipoglobuline " " "
- Une γ_1 macroglobuline " " "
- Une gamma globuline dont l'arc de précipitation absolument caractéristique est indiscutable.

Il reste deux arcs de précipitation qui n'ont pu être identifiés avec

certitude faute d'un antisérum spécifique que nous n'avons pu ni trouver dans les produits commercialisés, ni préparer pour le moment par suite des taux extrêmement faibles de ces composés dans le milieu étudié et des difficultés d'isolement. Nous pouvons dire cependant que ces deux fractions sont localisées dans la zone des alpha et bêta globulines.

La présence de molécules protéiques réagissant avec les immun-sérums antisérum humain telles l'albumine, les α_1 et bêta lipoprotéines et la γ_1 M globuline, semble indiquer une possibilité de filtration des protéines sériques à travers la paroi et leur fixation au sein même de cette paroi donnant ainsi aux protéines constitutives de l'aorte une origine sérique.

Cependant, la possibilité d'une synthèse endogène de fractions protéiques particulières aussi bien dans le tissu normal que dans le tissu en voie de dégénérescence, ne peut être écartée.

Enfin, aucune différence caractéristique n'a pu être enregistrée entre les extraits aortiques normaux et athéroscléreux.

CONCLUSION GÉNÉRALE

L'étude que nous avons réalisée sur la teneur en protéines et sur les fractions que l'on peut définir parmi ces composés a porté sur 25 tissus aortiques normaux et athéroscléreux.

La variabilité des causes de décès ne nous a pas permis de classer systématiquement chacun des prélèvements dans tel ou tel groupe. Nous nous sommes contentés de relever macroscopiquement l'importance des lésions d'athérosclérose et notre classification a été basée sur ce critère. Il s'agit peut-être là d'un jugement arbitraire, car nul ne peut dire que l'individu présentant un tissu aortique classé par exemple O.M.S. III serait certainement mort d'une atteinte athéroscléreuse si une affection de nature tout à fait différente n'était venu abrégé le cours de son existence.

Cependant, le problème auquel nous nous sommes intéressé étant un problème de biochimie tissulaire, cette classification est suffisante.

Les résultats analytiques intéressent : les protéines totales et les fractions déterminées par électrophorèse sur papier et immuno-électrophorèse.

Nous avons dans chacun de ces chapitres discuté les résultats obtenus par chacun de ces examens.

1) Les résultats analytiques obtenus lors des déterminations électrophorétiques semblent montrer indiscutablement des variations significatives

entre la teneur en fractions protéiques des tissus sains et athéroscléreux.

On observe en effet dans le tissu athéroscléreux une diminution significative de l'albumine, des globulines alpha I et alpha II et des globulines gamma. Par contre les bêta globulines sont nettement augmentées.

Il semble bien que le phénomène réactionnel principal porte sur l'augmentation des fractions bêta globuliniques dont de nombreux auteurs ont montré l'importance au cours de l'établissement du syndrome d'athérosclérose grâce au pouvoir de fixation que possèderaient ces molécules vis-à-vis des composés lipidiques.

Cette augmentation est confirmée d'ailleurs par la mesure des bêta lipoprotéines plus élevées dans le tissu athéroscléreux que dans le tissu sain.

2) L'analyse immuno-électrophorétique permet de préciser les données précédentes.

Nous pensons tout d'abord qu'il y a lieu d'éliminer la technique utilisant une extraction à froid par l'éther, car malgré les précautions prises les résultats obtenus sont nettement inférieurs à ceux de la méthode directe surtout en ce qui concerne l'identification des fractions lipoprotéiques.

Nous n'avons pu identifier avec certitude que cinq arcs de précipitation sur les sept obtenus.

Nous avons constaté qu'il existait bien les diverses fractions d'albumines et de globulines que l'électrophorèse sur papier nous avaient révélées, mais nous avons pu en outre préciser les points suivants.

- L'alpha I globuline obtenue par électrophorèse sur papier comprend certainement une part importante d'alpha I lipoprotéine de même que la fraction bêta.

- Par contre l'alpha II globuline isolée électrophorétiquement ne comprend pas de lipoprotéines ou une quantité extrêmement faible non décelable même à l'analyse immuno-électrophorétique. Cette alpha II globuline est certainement constituée pour sa plus grande part des deux fractions de mobilité alpha - bêta que nous n'avons pu identifier en immuno-électrophorèse.

- Enfin la présence nette d'une gamma I macroglobuline est très intéressante, car elle permet d'émettre des hypothèses sur l'origine des protéines aortiques.

Cette fraction n'existe qu'à un taux très faible dans le sérum sanguin normal. Sa présence nette dans le tissu aortique pourrait faire penser à une autre origine.

Cependant le problème de la filtration des molécules protéiques sériques à travers la paroi aortique semble bien établie pour la majorité des constituants protéiques isolés.

Il semble très probable que deux phénomènes se produisent simultanément: Un phénomène de filtration à travers la paroi et peut-être un processus de biosynthèse, du moins de façon partielle, sans que l'on puisse préjuger de l'antériorité de l'un par rapport à l'autre.

Les résultats obtenus semblent donc encourageants et permettent d'émettre des hypothèses que l'avenir confirmera peut-être.

Le Président de la Thèse :

Professeur ENSELME

VU, et permis d'imprimer

LYON, le 18 Mai 1965

VU, le Doyen :

J.F.CIER

Le Recteur, Président du

Conseil de l'Université,

P. LOUIS

B I B L I O G R A P H I E

- 1 - AGNERAY (J), MILHAUD (J.C.) et ORABONA (G) :

Technique simple et précise pour l'évaluation des protéinogrammes par électrophorèse sur papier.
Ann. Biol. Clin. 1960, 18 (10-12), 645.

- 2 - ARDRY (R) et DELAVILLE (M) :

Etude des conditions de valabilité de l'électrophorèse.
Ann. Biol. Clin. 1956, 14 (1-2), 39.

- 3 - ARONSSON (T), GRONWALL (A) et LAUSING :

Improved separation of serum proteins in paper electrophoresis.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1957, 9, 338.

- 4 - BISERTE (G):

Dispositif d'électrophorèse sur papier.
Biochim. Biophys. Acta 1950, 32, 601.

- 5 - BISERTE (G) et HAVEZ (R):

Enquête sur la technique de l'électrophorèse des lipoprotéines et sur ses résultats.
Ann. Biol. Clin. 1960, 18 (10-12), 687.

- 6 - BOIVIN (A):

Biochimie des antigènes et plus spécialement des antigènes bactériens.
Expos. Ann. Biochim. Med. 1947, 7, 64.

7 - BUTLER (J. A. V.) et STEPHEN (J. M. L.):

An apparatus for preparative electrophoresis.
Nature 1947, 160 , 469.

8 - CASPANI (R) et MAGISTRETTI (M) :

Nuova metodica di colorazione dei tracciati elettroforetici
carta da filtro.
Plasma 1954, 2 , 33.

9 - CHATAGNON (C) et CHATAGNON (P):

Etude des protéines cérébrales solubles de l'humain. Electrophorese en gélose et immuno-électrophorèse.
Ann. Biol. Clin. 1960, 7-9 (Juillet-Septembre) 428.

10 - CONSDEN (R), GORDON (A. H.) et MARTIN (A. J. P.):

Qualitative Analysis of Proteins : a partition chromatographic method using paper. Biochem. J. 1944, 38 , 224.

11 - COOLIDGE (P) et THOMAS (B) :

A simple cataphoresis apparatus.
J. Biol. Chem. 1939, 127 , 551.

12 - COOPER (D):

Effect of Borate Buffer on the electrophoresis of serum.
Nature 1958, 181 , 713.

13 - CREMER (H) et TISELIUS (A):

Elektrophorese von eiweis in filter papier.
Biochem. Z. 1950, 320 , 273.

14 - DE BOISSEZON (J. F.):

Etude de quelques cas de dysprotéinémie par l'association de l'immuno-électrophorèse et de l'électrophorèse de zone quantitative en gel d'agar agar.
Thèse Doct. Méd. Toulouse Juin 1959

15 - DREVON (M.B.):

Intérêt d'une présentation " Normalisée " des résultats de l'électrophorèse du sérum.
Ann. Biol. Clin. 1950, N° 1/2 , 66.

16 - DURRUM (E.L.):

A microelectrophoretic and microionophoretic technique.
J.Amer. Chem. Soc. 1950, 72 , 2943.

17 - DURRUM (E.L.), BLOCK (P.J.) et ZWEIG (G):

A manual of chromatography and electrophoresis.
Acad. Press. 1955, N.Y.

18 - ENSELME (J) et DREYFUS (J.Cl.):

Sémiologie électrophorétique des protéines du plasma sanguin et de l'hémoglobine.
Ed. Camugli Lyon 1955.

19 - FIELD (C.W.) et TEAGUE (O):

On electrical charge of the native proteins and the agglutinins.
J. expos. Med. 1957, 9 ,(86), 222.

20 - FLEURY (P) et Melle EBERNARD (R):

Recherches sur le dosage des protéines par la méthode photométrique au Biuret selon la technique de GORNALL.
Ann. Biol. Clin. 1951, 9 ; 453.

21 - FRANKLIN (A.E.) et QUASTEL (J.H.):

Paper chromatography of proteins and enzymes.
Science 1949 , 110 , 447.

22 - FREY J.:

Recherches relatives à l'extraction des protéines aortiques sur des fragments normaux et athéroscléreux.
Thèse Doct. Méd. 1960 Lyon.

- 23 - GERO (S), GERGEY (J.) JAKAB (L.), SZEKELY (J.) et VIRAG (S):

Comparative immuno-electrophoretic studies on homogenates of aorto, pulmonary arteries and inferior vena cava of atherosclerotic individuals.

J. Atheroscler. Res. 1961, vol. 1., 88.

- 24 - GIRARD (M.), DECHOSAL (J.) et ROUSSELET :

Pratique d'électrophorèse en biologie clinique.

Ed. G. Doin et Cie Paris 1958.

- 25 - GORDON (A.M.), KEIL (B), SEBESTA (K), KNESSL (O) et SORM (F.):

Electrophoresis of Proteins in Agar Jelly.

Coll. Trav. Chim. Tcheosl. 1950, 15, (I) 1 - 16.

- 26 - GRABAR (P):

Analyse immuno-électrophorétique : principe et quelques applications.

Schweiz. Med. Wschr. 1962, 92, (43) 1337.

- 27 - GRABAR (P) et BURTIN (P) :

L'analyse immuno-électrophorétique; premiers résultats obtenus avec des sérums pathologiques.

Press Med. 1955, 63, (38), 804.

- 28 - GRABAR (P), SELIGMANN (M) et BERNARD (J) :

Méthodes de préparation d'extraits leucocytaires et de sérums anti-leucocytaires susceptibles d'être utilisés pour des études immunochimiques.

Ann. Inst. Pasteur 1955, 89, 654.

- 29 - GRABAR (P) et WILLIAMS (C.A.) :

Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunologiques d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin.

Biochim. Biophys. Acta 1953, 10 (1) 193.

30 - GRABAR (P) et WILLIAMS (C.A.):

Méthode immuno-électrophorétique d'analyse de mélanges de substances antigéniques.

Biochim. Biophys. Acta 1955, 17 , (1) 67.

31 - GRASSMANN (W) et HANNIG (M):

Ein einfaches verfahren zur analyse der serum und andere protein gennische.

Naturwissenschaften 1950, 37 , 496.

32 - GRASSMANN (W) , HANNIG (K) et KNEDEL (M):

Über ein verfahren zur elektrophoretischen Bestimmung der serum-proteine auf filtrier-papier.

Dtsch. Med. Wsch 1950, 76 , 333.

33 - GROSS (J), LEBLOND (C.P.), FRANKLIN (A.E) et QUASTEL (J.H):

Presence of iodinated aminoacids in unhydrolyzed thyrofd.

Science 1950, 8 , 602.

34 - GUILLOT (M):

Divers aspects physico-chimiques de l'électrophorèse et en particulier de l'électrophorèse de zone.

Ann. Biol. Clin. 1956, (1-2), 8.

35 - HAUGAARD (G) et KRONER (T.D):

Partition chromatography of aminoacids with applied voltage.

J. Amer. Chem. Soc. 1948, 70 , 2135.

36 - HEIDELBERGER (M) et KENDALL (F.E):

Quantitative studies on antibody purification.

J. exp. Med. 1936, 64 , 161.

37 - HOFFPAUIER (C) et GUTHRIE (J.):

The use of aminized and phosphorilated cotton fabrics as ion exchange materials in the preparation of oil seed proteins.

J. Biol. Chem. 1949, 178 , 207.

38 - KAMINSKI (M):

Quelques observations sur la technique de précipitation spécifique en milieu gélifié d' OUCHTERLONY.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1954, 36 , 279.

39 - KAYAHAN (S):

Cholesterol binding capacity of normal and atherosclerosis intima
Lancet 1959, 7066, 223-224.

40 - KOIW (E), WALLENIIUS (G) et GRONWALL (A):

L'utilisation clinique de l'électrophorèse sur papier. Comparaison avec l'électrophorèse en tube selon la méthode de Tiselius. Bull. Soc. Chim. Biol. 1951, 33 , 1940.

41 - KÖNIG (P):

Resum III congres Sud Américain Clinica 1937, 2 , 334 , cité dans "Electrophorèse sur papier" par WUNDERLY (CH).
Ed. Vigot frères Paris 1956.

42 - KUNKEL (H.G) et TISELIUS (A):

Electromigration of proteins on filter paper.
J. Gen. Physiol. 1951, 35 , 89.

43 - LAPRESLE (C):

Etude de la dégradation de la sérum-albumine humaine par un extrait de rate de lapin.
Ann. Institut Pasteur, 1955, 89 , 654.

44 - LAUTSCH (W), MANECKE (G) et BROSER (W):

Herstellung und Anwendung von Ionenaustauscher-papier.
Z. Naturforsch 1953, 86 , 232.

45 - LEWIN (J) et HILLON (P):

Fixation et coloration des électrophorégrammes des protéines.
Ann. Biol. Clin. 1956, N° 1-2, 22.

46 - LOHMANN (D):

Über die Löslichen proteine der Gefässintima.
In H. PEETERS. Protides of the biological fluids,
Elsevier Ed. (Amsterdam), 1963, 10, 61.

47 - LODGE (O):

Brit. Assoc. Report 1886. Cité par AUDUBERT dans "Les principes
de l'électrophorèse". Presse Univers. Fr. 1957.

48 - LINDER et PICTON :

J. Chem. Soc. Lond. 1906, 61, 586. Cité par WUNDERLY (Ch)
dans Electrophorèse sur papier. Ed. Vigot frères Paris 1956.

49 - LÖFFLER (W) et WUNDERLY (Ch):

J. Clin. pathol. 1953, 31, 1036. Cité par WUNDERLY (Ch) dans
Electrophorèse sur papier. Ed. Vigot frères Paris 1956.

50 - LONGSWORTH (L.G): A modification of the method for use in électrophoretic analysis. J. Amer. Chim. Soc. 1939, 61, 529.

51 - MACHEBOEUF (M):

Microélectrophorèse des protéines dans le papier.
Dans "Technique de Laboratoire" Ed. Masson Paris 1954.

52 - MACHEBOEUF (M), BRUNERIE (M), REBEYROTTE (P) et DUBERT (J.M.):

Microélectrophorèse sur papier.
Expansion Scientifique Paris- 1954.

53 - MACHEBOEUF (M), BRUNERIE (M) et REBEYROTTE (P):

Applications aux sérums pathologiques, aux urines et aux liquides
d'ascite de la méthode de microélectrophorèse sur papier.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1951, 34, 1543.

54 - MACHEBOEUF (M) , DUBERT (J.M.) et REBEYROTTE (P):

Microélectrophorèse sur papier avec évaporation continue du solvant.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1953, 35, 334.

55 - MACHEBOEUF (M) et FAURE (M):

Constitution chimique des anticorps.
Expos. Ann. Bioch. Méd. 1942, 3, 134.

56 - MICHAELIS (L):

Elektrische Überführung von fermenten.
Biochem. Z., 1909, 16, 81.

57 - MICHEEL (F) et SCHWEPPE (H) :

Ein Verfahren zur papierchroma tographischen trenning und
analyse.
Naturwissen schaften 1952, 39, 380.

58 - MERCKLEN (P) et MASSAYEFF (R):

L'absorption d'albumine, cause d'erreur dans l'appréciation
quantitative des protéines sériques dans l'électrophorèse sur
papier filtre.
C.R. Soc. Biol. 1952, 146, 1905.

59 - MOON (H.D.):

Coronary arteries in fetuses infants and juveniles.
Circulation 1957, 16, 263.

60 - MOON (H.D.):

Connective tissue reactions in the developement of arterioscle-
rosis. In I.H. Page. Connective tissue thrombosis and athero-
sclerosis Acad. Press. Ed (N.Y.) 1959.

61 - MOON (H.D.) and RINEHART (J.F.):

Histogenesis of coronary arteriosclerosis.
Circulation. Res. 1952, 61, 481.

62 - MORGAN (W.T.J.):

Studies on immunichemistry of a specific antigenic substance
from B. Dysenteriae.
Biochem. J. 1937, 31, 2003.

63 - ORG. mond. Santé. Serv. Rapp. Techn.:

Classification des lésions d'athérosclérose
1958, 4 . (143), 3.

64 - OUCHTERLONY (O):

Antigen - antibody reactions in gel.
Acta pathol. microb. Scand. 1949, 26, 507.

65 - OUCHTERLONY (O):

Quantitative immunoelectrophoresis . - Acta
pathol. microb. Scand. Suppl. 1962, 154, 252.

66 - PERRIN (A) :

Etude histochimique des protéines de l'athérosclérose humaine.
Path. et Biol. 1962, 10-12 , 85.

67 - PEZOLD (A) et KOFES (A):

Beitrag zur photometrie gefärbter filtrier papierstrifen mittels
der transparenzverfahrens.
Klin. Wschr. 1954, 32, 504.

68 - RACADOT (A):

L'électrophorèse en tampon "TRIS - E.D.T.A. -Borate".
Thèse Méd. Nancy 1960.

69 - REBEYROTTE (P)et DE CRAEMER (P.L.):

Microélectrophorèse -Papier - Gélose - Amidon - Electrophorèse
Ed. M. Weissenbruch. S.A. Bruxelles 1954.

70 - SANY (Cl.):

Immuno-électrophorèse . Applications en biologie.
Thèse Doct. Pharm. Montpellier Mars 1961.

71 - SALVINIEN (J):

La réaction antigène - anticorps.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1957, suppl. N°1, 11.

72 - SCHEIDEGGER (J.J):

Une microméthode de l'immuno-électrophorèse.
Int. Arch. Allergy 1955, 7, (2), 103.

73 - SCHEIDEGGER (J.J.):

L'immuno-électrophorèse.
Sem. Hôp, Paris 1956, 32, (37), 2119.

74 - SCHEIDEGGER (J.J.):

L'analyse immuno-électrophorétique des liquides biologiques.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1957, 37 (suppl.1) 45.

75 - SCHEIDEGGER (J.J.) et ROULET (H.):

Applications pratiques de la méthode immuno-électrophorétique;
premiers résultats.
Praxis Berne 1955, 44, (4), 73.

76 - SCHNEIDER (G) et WUNDERLY (Ch):

Die papierelektrophorese als schnell methode des klinisch-
chenisch- chemischen laboratoriums.
Schweiz - med. wschr 1952, 82 445.

77 - SVENSSON (H):

Electrophoresis by the moving boundary method. A theoretical
and experimental study.
Arkiv fur kemmi Band 1946, 22A, 10.

78 - SVENSSON (H) et BELFANTI (S):

Paper electrophoresis of serum. Reproducibility and comparaisn
with U tube electrophoresis.
Plasma 1954, 2, 503.

79 - SVENSSON (H) et BRATTSTEN (I):

An apparatus for continuous electrophoretic separation in flowing liquids.

Arkiv. Kemi 1949, 1, 401.

80 - SWAHN (B):

A method for localisation and determination of serum lipids after electrophoretic on filter paper.

Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1952, 4, 98.

81 - TISELIUS (A):

The moving boundary method for studying the electrophoresis of proteins.

Nova Acta Rigenae Soc. Sci. Upsa liensis; 1930, 7 (4), 1.

82 - TISELIUS (A):

A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal.

Trans Faraday Soc. 1937, 33, 524.

83 - TISELIUS (A):

Electrophorèse et chromatographie dans la chimie des protéines
Ist. Sup. Sanita Rendir. Ital. 1950, 13, (11-12), 916.

84 - TURBA (F) et EVENKEL (H):

Elektrophorese von proteine in filter papier.

Naturwissenschaften, 1950, 37, 93.

85 - URIEL (J):

Les réactions de caractérisation des constituants des liquides biologiques après électrophorèse en gélose.

Clin. Chim. Acta 1958, 3, (1), 17.

86 - URIEL (J) et GRABAR (P):

Etude des lipoprotéines sériques par l'électrophorèse en gélose et l'analyse immuno-électrophorétique.

Bull. Soc. Chim. Biol. 1956, 38, (11) 1253.

87 - URIEL (J) et SCHEIDEGGER (J.J):

Electrophorèse en gélose et coloration des constituants.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1955, 37, (1), 165.

88 - VALDIGUIE (P) et DOUSTE-BLAZY (L):

Les protéines solubles du tissu aortique.
Toulouse Méd. 1959, 60, 204.

89 - VALDIGUIE (P), DOUSTE-BLAZY (L) et LAVABRE (Th):

Electrophorèse des protéines solubles de l'aorte.
C.R. Soc. Biol. Paris 1958, 152, 1590.

90 - VON KLOBUSITSKY (D) et KONIG (P):

Bioschemische studien über die gifte der Slangengahrung bothrop.
Arch. exp. path. Phark. 1939, 192.

91 - WOLF (G) et MAGNIN (P):

Remarque sur l'emploi de l'amido-Schwartz 10 B comme révélateur des fractions de protides obtenues par électrophorèse sur papier.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1954, 36, 925.

92 - WRENN (H. T.) et FEICHTMEIR (T. V.):

The quantitation of albumin based on its dye bending capacity.
Amer. J. Clin path., 1956, 26, 960.

93 - WUNDERLY (Ch):

La méthode d'électrophorèse sur papier et ses limitations.
Expos. Ann. Biochim. Méd. Ed. Masson 1952, 14, 173.

94 - WUNDERLY (Ch):

Electrophorèse sur papier.
Ed. Vigot frères Paris 1956.

95 - WUNDERLY (Ch):

Immunoelectrophoresis : methods, interpretation, results.
Advanc. Clin. Chem. U.S.A., 1961, 4 , 204.

96 - ZANUSSI (E), INVERNIZZI (F), LUPORINI (G), GIACCO (G.S. Del):

Principe et possibilités d'application de l'immuno-électrophorèse. Atti. Accad. Med. Lombarda, 1960, 15 (2), 82.

T A B L E d e s M A T I E R E S

INTRODUCTION	1
CHAPITRE PREMIER : ETUDE DES TECHNIQUES UTILISEES.....	5
I) Technique d'extraction	6
II) Electrophorèse sur papier	10
1) Historique	10
2) Etude de la théorie de l'électrophorèse	12
- Principe	12
- Appareillage	14
- Papier	17
- Tampons	19
- Colorants	21
- Appréciation quantitative des fractions	24
- Facteurs influant sur la mobilité	26
3) Technique proprement dite	28
- Matériels et réactifs	28
- Mode opératoire	31
III) Electrophorèse libre ou "Moving boundary method".....	33
- Principe	33
- Description de l'appareil	34
- Etude comparative de l'électrophorèse sur papier et de l'électrophorèse libre	36
IV) Immuno-électrophorèse	37
1) Généralités	37
2) Etude de la théorie de l'immuno-électrophorèse.....	37
- Principe	37
- Etude des réactions antigène - anticorps	38
- Préparation des immuns sérums	41
- Etude de la gélose ou "Agar - agar"	43

	124
3) Technique proprement dite	44
- Réactifs	45
- Matériel	49
- Technique	53
4) Avantages de l'immuno-électrophorèse	57
CHAPITRE DEUXIEME : ETUDE DES RESULTATS OBTENUS	60
I) Observations anatomiques des aortes	61
II) Appréciation macroscopique du degré des lésions	63
III) Résultats analytiques	72
1) Dosage des protéines totales	72
2) Electrophorèse libre	74
3) Electrophorèse sur papier	76
4) Immuno-électrophorèse	89
CONCLUSION GENERALE	106
BIBLIOGRAPHIE	110
TABLE DES MATIERES	123

